

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I. Nutrición



TESIS DOCTORAL

**Biomarcadores de luteína, zeaxantina y otros
carotenoides en la relación dieta y salud ocular humana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Rocío Estévez Santiago

Directoras

**Begoña Olmedilla Alonso
Beatriz Beltrán de Miguel**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE**
MADRID

**Biomarcadores de luteína, zeaxantina y otros
carotenoides en la relación dieta y salud ocular humana**

Memoria presentada por **Rocío Estévez Santiago** para optar al grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid

Bajo la dirección de:

Dra. Begoña Olmedilla Alonso (ICTAN-CSIC)

Dra. Beatriz Beltrán de Miguel (UCM)

Madrid, 2015



Begoña Olmedilla Alonso (Investigador Científico de el CSIC) y Beatriz Beltrán de Miguel (Profesor Contratado Doctor de la UCM)

CERTIFICAN

Que la presente memoria titulada “Biomarcadores de luteína, zeaxantina y otros carotenoides en la relación dieta y salud ocular humana”, cuya autora es Rocío Estévez Santiago para optar al grado de Doctor ha sido realizada en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) bajo su dirección, y que hallándose concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a 27 de octubre de 2015

Begoña Olmedilla Alonso

Beatriz Beltrán de Miguel



Biomarcadores de luteína, zeaxantina y otros carotenoides en la relación dieta y salud ocular humana

Tesis doctoral presentada por:

ROCÍO ESTÉVEZ SANTIAGO

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Vº Bueno de las directoras:

Fdo. Dra. Begoña Olmedilla Alonso

Fdo. Dra. Beatriz Beltrán de Miguel

Vº Bueno de la directora del Departamento:

Fdo. Dra. Ana María López de Sobaler

El presente memoria ha sido realizada en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC).

El trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- Proyecto PS09/00681 del Programa de Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica)
- Proyecto iLINK- 0770 del Programa para la promoción de la colaboración científica internacional con instituciones Extranjeras, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

La tesis doctoral ha sido realizada gracias a la beca concedida a Dña Rocío Estévez Santiago dentro del programa para la formación de Investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas “Junta para la Ampliación de Estudios” (JAE-Predoc 2011) y cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

AGRADECIMIENTOS

Por fin entrego la tesis...por fin veo todo el esfuerzo de estos años plasmado en un papel (en mucho papel)... Aunque solamente llevo cuatro años en el ICTAN, me han cundido tanto que, cuando miro hacia atrás, parece que llevo aquí mucho más, por todo lo que he aprendido, todo lo que he crecido, tanto profesional, como personalmente y por todas las personas a las que he conocido.

Quiero empezar agradeciendo especialmente a Begoña todo lo que me ha enseñado durante este tiempo. Contigo he aprendido sobre todo a buscar siempre la excelencia en mi trabajo y a mejorar todo hasta lo inmejorable. Pero lo que principalmente me has aportado estos años ha sido un ejemplo de integridad, honestidad, y valores, mostrándome que se puede triunfar profesionalmente en este mundo sin descuidar otras cosas más importantes. Gracias por tu apoyo, tu consuelo en los momentos difíciles (que los ha habido), y por preocuparte tantísimo por mí. Quiero que sepas que me has marcado para siempre.

Bea y Miky vosotras sois la razón de que me metiera en este lío. Vosotras habéis hecho que quiera dedicar mi vida a la docencia, y me acompañasteis en mis primeros años de doctorado. Quiero agradecereros vuestro grandísimo cariño, apoyo constante, calidez y cercanía, quiero agradecereros que hagáis la vida tan fácil a los de alrededor.

También quiero dedicar unas palabras a todas las buenísimas amigas y compañeras de fatigas que he tenido la suerte de recopilar durante estos

años: Gracias Gema, por estar siempre pendiente de que estuviera bien de verdad, aunque yo siempre diga que estoy bien, gracias Marisa, porque tú y yo hemos estado juntas desde el principio en las alegrías y en las penas, gracias Isa, por confiar y apoyarte en mí cuando lo necesitaste, gracias Elena (mi malagueña), por estar siempre tan presente, tan cercana y tan conectada conmigo a pesar de estar lejos, gracias Sara por tu sonrisa, por tus charlas y por tu serenidad, gracias Irene (Fernández) por ser imprescindible para mí (tanto en el laboratorio como fuera de él), gracias Natalia porque aunque has estado poco tiempo, has estado intensamente, gracias Irene (Romero) por estar tan pendiente de mí sobre todo cuando las cosas se han puesto más feas, y por ser tan cariñosa como eres, gracias a la Marta, por estar siempre dispuesta a ayudar y escuchar.

Gracias al resto del departamento, que con sus desayunos y sus charlas por los pasillos me han hecho la vida más agradable. Especialmente quiero dar las gracias a Sonia, Jara, Nines, y Jose Manuel.

También quiero darles miles de gracias a otras personas con las que no he compartido despacho ni laboratorio, pero que con su cariño, sus sonrisas y su preocupación por mí, han sido pilares fundamentales durante mi estancia en el Instituto: miles de gracias Isabel (Fernández), Carmen (de la Mata), Pilar, Angelines, Gloria, y Ramón.

No quiero olvidarme de Elena y Cari, mis compañeras de aventuras en Manchester, miles de gracias por hacer que la pesadilla de pasar más de un mes separada de Rafa y Álvaro, fuera muchísimo más llevadera, gracias

porque sé que, aunque parezca un poco adolescente lo que voy a decir, en ese tiempo gané dos grandes amigas para toda la vida.

Quiero darle las gracias a toda mi familia por todo el apoyo que me han dado durante estos años, tanto emocional como logístico, que me ha permitido dedicar cabeza y cuerpo a terminar la tesis. Pero sobre todo quiero darle las gracias a Álvaro, por haberme puesto tan fáciles las cosas, por haber tenido tanta paciencia en esta última etapa (sé que una embarazada de gemelos en la última etapa de tesis no es muy llevadera), y por haberse comportado de manera idónea en las situaciones más difíciles de mi vida.

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	17
INDICE DE FIGURAS.....	19
ABREVIATURAS	21
RESUMEN	23
ABSTRACT	29
INTRODUCCIÓN	35
1. Carotenoides	37
1.1 Estructura	38
1.2 Propiedades físico-químicas	41
1.2.1 Solubilidad.....	41
1.2.2 Absorbancia	42
1.2.3 Inactivación de especies reactiva de oxígeno.....	44
2. Carotenoides en el contexto dieta salud	46
2.1 Fuentes alimentarias de carotenoides.	46
2.1.1 Factores que influyen en el contenido de carotenoides en frutas y hortalizas 49	
2.1.2 Principales fuentes de carotenoides en la dieta española	50
2.2 Absorción y metabolismo	51
2.2.1 Absorción	51
2.2.2 Metabolismo	53
2.3 Actividad biológica.....	56
2.3.1 Actividad antioxidante	57
2.3.2 Filtro de luz azul.	59
2.3.3 Precursores de retinol.....	60
3. Los carotenoides de la dieta en la salud ocular	63
3.1 Carotenoides provitamínicos.....	63
3.1.1 Recomendaciones de ingesta de vitamina A y de carotenoides provitamina A 65	
3.2 Luteína y zeaxantina	67
3.2.1 Recomendaciones de ingesta de luteína y zeaxantina	69
4. Bioaccesibilidad	72
4.1 Descripción y comparación de métodos de digestión <i>in vitro</i>	74
4.1.1 Preparación de alimento	74
4.1.2 Masticación e insalivación-fase oral	76
4.1.3 Fase gástrica.....	77
4.1.4 Fase intestinal	78
4.1.5 Incorporación en micelas.....	78
4.1.6 Expresión de resultados.....	79
4.2 Método de digestión <i>in vitro</i> estático estandarizado aplicable a alimentos. Documento de consenso internacional.....	80
5. Evaluación del estado nutricional	82
5.1 Marcador de exposición de carotenoides provitamínicos y no provitamínicos: la dieta 83	
5.1.1 Recogida de datos de dieta.....	84

A) Encuestas nacionales	85
B) Encuestas familiares o realizadas en pequeños colectivos homogéneos.....	85
C) Encuestas dietéticas para valoración de ingesta individual.....	86
5.1.2 Transformación de los datos de ingesta de alimentos.....	89
Criterios para la adecuada selección de las tablas y bases de datos de composición de carotenoides en alimentos	90
5.1.3 Comparación con las ingestas de referencia	92
5.2 Marcadores de estatus de carotenoides.....	92
5.2.1 Carotenoides provitamínicos.....	94
5.2.2 Luteína y zeaxantina	95
5.2.2.1 Concentraciones en suero.....	95
5.2.2.2 Densidad de pigmento macular	97
5.3 Marcadores de efecto sobre la función visual	98
OBJETIVOS	101
MATERIAL Y MÉTODOS	105
1. Determinación de carotenoides en alimentos.....	107
1.1 Extracción de carotenoides de alimentos	107
1.1.1 Análisis de carotenoides mediante HPLC	109
1.1.2 Curvas de calibrado en las columnas C18 y C30.....	111
1.2 Método de digestión <i>in vitro</i> para determinación de la bioaccesibilidad de carotenoides a partir de frutas.....	114
1.2.1 Extracción de carotenoides a partir de alimentos digeridos.....	116
1.2.2 Valoración de la actividad enzimática de los enzimas implicados en la digestión <i>in vitro</i>	117
2. Marcadores de estatus de carotenoides en humanos.....	121
2.1 Marcador de exposición: Dieta	123
2.1.1 Compilación de base de datos de carotenoides.....	125
2.1.2 Desarrollo de aplicación informática para el cálculo de ingesta dietética de carotenoides.....	126
2.2 Marcadores de estatus.....	128
2.2.1 Concentración de carotenoides en suero.....	128
2.2.2 Determinación de la densidad del pigmento macular	130
2.3 Marcador de función visual: la sensibilidad al contraste (SC).....	134
3. Análisis estadístico	137
RESULTADOS	141
Capítulo 1: Efecto de la ingesta de luteína, zeaxantina y carotenoides provitamínicos sobre el estatus nutricional.	143
Capítulo 2: Efecto de la ingesta de carotenoides sobre la salud.	215
Capítulo 3. Efecto del estatus sobre los indicadores funcionales y los objetivos de saludocular.	281
DISCUSIÓN INTEGRADORA	285
1. Efecto de la ingesta de luteína, zeaxantina y carotenoides provitamínicos sobre el estatus nutricional.....	288
1.1 Marcadores de ingesta de luteína y zeaxantina.....	293
1.2 Marcadores de estatus (concentración en suero y densidad de pigmento macular).....	295
1.3 Correlaciones entre ingesta y marcadores de estatus.....	297

2. Efecto de la ingesta de carotenoides sobre marcadores de la salud ocular.....	305
2.1 Ingesta de luteína y zeaxantina en relación con la salud ocular	306
2.2 Ingesta de carotenoides en relación con la salud de la población española	309
2.2.1 Luteína y zeaxantina	309
2.2.2 Carotenoides provitamínicos.....	312
3. Efecto del estatus de luteína y zeaxantina sobre los indicadores funcionales de salud ocular.....	316
CONCLUSIONES	321
REFERENCIAS	329
ANEXOS	353
Anexo 1: Autorización del Comité Ético de Investigación Clínica	355
.....	357
Anexo 2: Documento de información voluntarios del estudio del proyecto AES PS09/00681.....	359
Anexo 3: Consentimiento informado de los voluntarios del estudio del Proyecto AES PS09/00681.....	365
Anexo 4: Encuesta dietética utilizada para el estudio del Proyecto AES PS09/00681.	369

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Longitud de onda de máxima absorción [λ (nm)] y coeficiente de extinción ($A_{1\%}^{1\text{cm}}$) de los carotenoides mayoritarios en sangre (Scott 2001).....	44
Tabla 2. Tres posibles reacciones de los carotenoides con radicales (R^\cdot) (Krinsky <i>et al.</i> 2005).....	58
Tabla 3 Recomendaciones de ingesta de Vitamina A de diversos países y organismos internacionales (Efsa Panel on Dietetic Products <i>et al.</i> 2015)	66
Tabla 4. Datos de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ y longitud de onda tomados de De Ritter <i>et al.</i>	111
(De Ritter <i>et al.</i> 1981)	111
Tabla 5. Características de las curvas patrón para análisis de alimentos con columna C18.....	112
Tabla 6. Características de las curvas patrón (concentraciones altas) para análisis de alimentos con columna C30.	113
Tabla 7. Características de las curvas patrón (concentraciones bajas) para análisis de alimentos con columna C30.	114
Tabla 8. Características de las curvas patrón para análisis de suero con columna C18.	129

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de síntesis de los carotenoides (Hannoufa 2011).....	39
Figura 2. Ejemplo de las configuraciones <i>cis</i> - y <i>trans</i> -.....	39
Figura 3. Estructura de los carotenoides mayoritarios en sangre.....	41
Figura 4. Espectro de absorción en el visible de licopeno (—), γ -caroteno (----), β -caroteno (-.-.-.) y α -caroteno (.....) en éter de petróleo.	43
Figura5. Imagen de relación estructural entre retinol y los provitamínicos.....	48
Figura 6. Proceso de absorción de los carotenoides (Nagao 2011).	55
Figura 7. Metabolismo de carotenoides y retinoides (Perusek <i>et al.</i> 2013).	56
Figura 8. Esquema que muestra una sección transversal del ojo en el que se señala la retina y la mácula (Stringham <i>et al.</i> 2010).	59
Figura 9. Espectro de absorción de luteína y zeaxantina de la retina (de Bone <i>et al.</i> , 1992) comparado con el espectro visible (Stringham <i>et al.</i> 2010).	60
Figura 10. Absorción de luz por los pigmentos visuales produce la fototransducción (Perusek <i>et al.</i> 2013).....	62
Figura 11. Esquema de las diferentes definiciones de bioaccesibilidad.	73
Figura 12. Esquema de la relación entre los marcadores en la evaluación del estado nutricional.....	83
Figura 13. Cromatograma de un extracto de canónigo obtenido con la columna C18.	113
Figura 14 Cromatograma de un extracto de níspero con la columna C30.....	114
Figura 15. Esquema de estudio Biomarcadores de luteína y zeaxantina.....	122
Figura 16. Esquema del estudio basado en ENIDE.	123
Figura 17. Cromatograma de un extracto de carotenoides a partir de suero con columna C18.	130
Figura 18. Imagen del dispositivo de medición de la DOPM.....	132
Figura 19. Gráfica obtenidas tras la realización de la prueba con el dispositivo MPS 9000. Resultados de la prueba periférica (línea con guiones) y la central (línea continua) (Murray <i>et al.</i> 2013).	134
Figura 20. Dispositivo Contrast Glaretester CGT-1000.....	135
Figura 21. Gráfica obtenida tras la prueba de sensibilidad al contraste.....	136

ABREVIATURAS

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

BCDO2: β,β -caroteno 9,10-dioxigenasa

BCMO1: β,β -caroteno 15,15'-monooxigenasa

BDCA: Bases de datos de composición de alimentos

DMAE: Degeneración macular asociada a la edad

DOPM: Densidad óptica de pigmento macular

EAR: Equivalentes en Actividad de Retinol

EFSA: European Food Safety Authority

ENIDE: Encuesta Nacional de Ingesta Dietética

ER: Equivalentes de retinol

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FESNAD: Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HPLC: High-performance liquid chromatography

IOM: Institute of Medicine

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

MTBE: Metil terbutil eter

OMS: Organización Mundial de la Salud

PC: Porción comestible

PDA: Detector de fotodiodo array

PM: Pigmento Macular

SC: Sensibilidad al contraste

SGF: Fluido simulador gástrico

SIF: Fluido simulador intestinal

SR-B1: Class B-type 1 scavenger receptor

SSF: Fluido simulador de saliva

TAME: p-tolueno-sulfonil-L-arginina metil éster

ATCA: Acido tricloroacético

TCA: Tablas de composición de alimentos

TEA: Trietil amina

THF: Tetrahydrofurano

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

WCRF: World Cancer Research Fund

RESUMEN

RESUMEN

El estudio de la relación entre componentes de la dieta y la salud/enfermedad utiliza métodos de valoración de la ingesta dietética, del estatus nutricional y de marcadores de función o de efecto. En concreto, en el estudio de los carotenoides y la salud ocular, interesa el estudio de dos carotenoides sin actividad provitamina A, la luteína y la zeaxantina, por su posible papel en la optimización de la función visual y en la prevención de enfermedades crónicas asociadas a la edad, y de tres carotenoides con actividad provitamina A: β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina, por ser precursores de retinol, nutriente del que depende el ciclo visual para una visión normal. En el presente trabajo se ha llevado a cabo el estudio de los carotenoides de la dieta más relevantes para la salud ocular humana considerando de forma simultánea parámetros relacionados con la ingesta, el estatus y la función visual, así como diversas variables que pueden modificar el estatus nutricional, como son la concentración de lípidos en sangre, y la bioaccesibilidad de los carotenoides a partir de alimentos de amplio consumo.

El trabajo experimental implicó análisis de carotenoides en alimentos y en sangre humana (marcador de estatus) mediante cromatografía líquida de alta eficacia, procedimientos de digestión *in vitro* para la determinación de la bioaccesibilidad de carotenoides provitamínicos, determinación de la densidad óptica del pigmento macular (marcador de estatus) con el uso de un dispositivo (MPS9000) basado en la fotometría heterocromática de parpadeo, y para la evaluación de la agudeza visual (marcador de función) se realizaron pruebas de sensibilidad al contraste (con y sin deslumbramiento) con el equipo Contrast Glaretester CGT-1000 (Takagi, Japan), y la valoración de la ingesta de frutas, hortalizas y huevos, e ingesta dietética de

carotenoides (marcadores de exposición) se llevó a cabo mediante encuesta dietética (tres R24h). Para la valoración de la ingesta dietética de carotenoides se utilizó una aplicación informática (Estévez-Santiago *et al.* 2013), desarrollada a partir de una base de datos de composición de alimentos que incluye contenido individualizado de carotenoides en los alimentos más consumidos en la dieta española (Beltrán *et al.* 2012).

Los resultados aportan datos sobre el contenido y la bioaccesibilidad de carotenoides en alimentos de amplio consumo en la población española. La bioaccesibilidad de β -caroteno fue semejante a la de β -criptoxantina y ambas superiores a α -caroteno en los siete alimentos analizados (los mayores contribuyentes a la ingesta de β -criptoxantina en población española).

Dentro de los estudios en humanos, como marcadores de exposición a la ingesta de carotenoides se identificaron determinadas frutas y hortalizas, y huevos (en un grupo de sujetos adultos aparentemente sanos: frutas y hortalizas: 458,7 g/día, huevos 21,3 g/día; y en una muestra representativa de la población española frutas y hortalizas: 392 g/día, huevos 27,1 g/día). También se estudió el consumo de luteína y zeaxantina tanto en la muestra de características bien definidas (1 168,3 $\mu\text{g/día}$, superior en el grupo de mayor edad) como en la muestra representativa de la población española (1 235,2 $\mu\text{g/día}$), así como la ingesta de carotenoides provitamínicos [β -caroteno (1 514,6 $\mu\text{g/día}$), β -criptoxantina (322,4 $\mu\text{g/día}$), α -caroteno (269,2 $\mu\text{g/día}$)] en ésta última muestra.

La evaluación simultánea de marcadores de ingesta y estatus de luteína y zeaxantina y de función visual, se realizó en el grupo de sujetos adultos aparentemente sanos con edades comprendidas en dos rangos de edad. Los resultados incluyen las concentraciones séricas de luteína y zeaxantina (14,4 $\mu\text{g/dl}$) que fueron mayores en el grupo de mayor edad, y la densidad óptica de pigmento macular (DOPM) (0,35 du) que es mayor en el grupo más joven, al igual que el marcador de función (sensibilidad al contraste). Por último se estudió la relación entre los diferentes marcadores, determinándose que existe, en general, mayor relación entre dieta y marcadores de

estatus y función, al considerar la ingesta de frutas y hortalizas, que la ingesta de luteína y zeaxantina. Al dividir ésta ingesta en función de sus fuentes, hortalizas y alimentos verdes aportaron mayores cantidades de luteína y zeaxantina pero las correlaciones con marcadores de estatus fueron más fuertes para frutas y alimentos rojo-anaranjados, grupos muy relacionados entre sí. Por último, el marcador de función SC estuvo influido por ingesta de frutas y hortalizas, luteína en suero y DOPM.

Como conclusiones generales y en consonancia con los objetivos planteados, cabe señalar que en el presente trabajo se han aportado herramientas específicas y fiables que facilitan la información sobre el contenido individualizado de carotenoides en alimentos y en la dieta humana, que han sido aplicadas en los estudios observacionales y de bioaccesibilidad realizados.

El estatus nutricional de luteína y zeaxantina se debería expresar en relación con la concentración de lípidos en suero y en el establecimiento de rangos de referencia de dicho estatus se debe considerar la edad de los sujetos. En el estatus nutricional de luteína y zeaxantina influye el tipo de matriz alimentaria de sus fuentes (hortalizas vs frutas) más que la concentración de estos carotenoides los alimentos. Este estatus nutricional es predictor de la agudeza visual (sensibilidad al contraste) en sujetos mayores de 45 años.

La bioaccesibilidad de β -criptoxantina y α -caroteno en comparación con la del β -caroteno, junto con otros datos en los estudios observacionales, parecen indicar que la contribución de estos carotenoides provitamínicos a la ingesta de vitamina A es mayor de la actualmente establecida (mediante ER, EAR), la cual debería ser revisada.

ABSTRACT

ABSTRACT

The study of the relationship between dietary components and health / disease uses methods for assessing dietary intake, nutritional status and markers of function or effect. Specifically, in the study of carotenoids and eye health, it is interesting the study of two carotenoids without provitamin A activity, lutein and zeaxanthin, for its possible role in optimizing visual function and the prevention of chronic diseases associated with age, and three carotenoids with provitamin A activity: β -carotene, α -carotene and β -cryptoxanthin, because they are retinol precursors, nutrient which visual cycle depends for normal vision. In the present work it has been carried out the study of dietary carotenoids relevant to human health, considering simultaneously parameters related to intake, status and visual function, and various variables that may modify nutritional status, such as blood lipid concentration, and the bioavailability of carotenoids from foods widely consumed.

The experimental work involved analysis of carotenoids in food and human blood (status marker) by high-performance liquid chromatography, in vitro digestion procedures for determining provitamin A carotenoids bioaccessibility, macular pigment optical density determination (status marker) using a device (MPS9000) based on the heterochromatic flicker photometry, for the evaluation of visual acuity (function marker) contrast sensitivity test was performed (with and without glare) with the Contrast Glaretester device CGT-1000 (Takagi, Japan), and the assessment of the consumption of fruits, vegetables and eggs, and dietary intake of carotenoids (exposure markers) were carried out by dietary survey (three

R24h). A computer application (Estevez-Santiago et al. 2013), developed from a food composition database including individual carotenoids content in the most consumed food in the Spanish diet (Beltran *et al.* 2012), was used for the assessment of the carotenoid dietary intake.

The results provided information on the content and bioavailability of carotenoids in foods widely consumed by the Spanish population. The bioavailability of β -carotene was similar to that of β -cryptoxanthin and both above that of α -carotene in the seven foods analyzed (mayor contributors to β -cryptoxanthin intake in Spanish population).

In human studies, as markers of exposure to the intake of carotenoids certain fruit and vegetables, and eggs were identified (in a group of apparently healthy adult subjects: fruits and vegetables: 458.7 g/day, eggs: 21.3 g/day and in a representative sample of the Spanish population: fruits and vegetables: 392 g/day, eggs 27.1 g/day). Consumption of lutein and zeaxanthin were also studied both in the well-defined sample (1 168.3 g/day higher in the older group) and in the representative sample of the Spanish population (1 235.2 g/day) and provitamin carotenoids intake [β -carotene (1 514.6 mg/day), β -cryptoxanthin (322.4 g/day), α -carotene (269.2 g/day)] in this last sample.

Simultaneous assessment of status and intake markers of lutein and zeaxanthin and visual function were performed in the group of apparently healthy adult subjects (two age ranges). The results included serum concentration of lutein and zeaxanthin (14.4 mg/dl) that are higher in the older group, and macular pigment optical density (MPOD) (0.35 du) which

is higher in the younger group, as the function marker (contrast sensitivity). Finally, the relationship between different markers was studied, determining that there is generally greater relationship between diet, and status and function markers, considering the intake of fruits and vegetables, than the intake of lutein and zeaxanthin. By dividing this intake according to their sources, vegetables and green foods provided greater amounts of lutein and zeaxanthin but correlations with markers of status were stronger for fruit and red-orange food, closely interrelated groups. Finally, the contrast sensitivity (function marker) was influenced by fruit and vegetable intake, serum lutein and MPOD.

As general conclusions and according to the objectives, it should be noted that in this work we have provided specific and reliable tools for supplying information about individual carotenoids content in foods and in the human diet, which have been applied in observational and bioavailability developed studies.

The nutritional status of lutein and zeaxanthin should be expressed in relation to the concentration of serum lipids, and in establishing reference ranges of this status, age of subjects should be considered. Nutritional status is more strongly influenced by the kind of food matrix of the food source (vegetable vs fruits) of lutein and zeaxanthin than by the concentrations of those xanthophylls. This nutritional status is a predictor of visual acuity (contrast sensitivity) in subjects older than 45 years.

The bioavailability of β -cryptoxanthin and α -carotene compared with that of β -carotene, along with other data from observational studies, suggest that the contribution of these provitamin carotenoids to vitamin A

intake is greater than the currently established (by ER, EAR), which should be revised.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Carotenoides

Los carotenoides no son simplemente *otro grupo de pigmentos naturales*. Son sustancias con importantes propiedades muy especiales que ningún otro grupo de sustancias poseen y que forman la base de sus numerosas y variadas funciones y acciones en toda clase de organismos vivos. Conocidos tradicionalmente como pigmentos de plantas, estos compuestos tienen una distribución mucho más amplia, ya que están presentes en animales y microorganismos. Los llamativos colores de la naturaleza que son debidos a los carotenoides son familiares para todos, pero otros papeles menos fácilmente reconocibles hacen de los carotenoides componentes esenciales en los organismos con fotosíntesis oxigénica. Estos compuestos desarrollan importantes funciones en la naturaleza, incluyendo la captación de la luz, la fotoprotección, los patrones de coloración de defensa y sexuales en muchas especies animales y son precursores de vitamina A en vertebrados (Britton 1995).

El término “caroteno” fue propuesto por Wachenroder en 1831 para denominar a un pigmento hidrocarbonado que cristalizó a partir de la zanahoria. Poco después, Berzelius denominó “xantofilas” a un extracto más polar de pigmentos de color amarillo procedente de hojas (en otoño). Tswett separó muchos de estos pigmentos cromatográficamente y denominó al grupo “carotenoides”. Desde finales de 1800 hasta principios

de 1900 han sido propuestas otras denominaciones, pero son esos tres nombres los que han permanecido (Olson *et al.* 1995).

1.1 Estructura

Los carotenoides son pigmentos liposolubles, en su mayoría tetraterpenoides ($C_{40}H_{56}$), formados por ocho unidades de isopreno unidas de tal forma que su secuencia se invierte en el centro de la molécula. Los carotenoides son sintetizados por uniones “cola - cola” de dos moléculas C_{20} de geranilgeraniol difosfato (Figura 1). El esqueleto básico y simétrico, que puede ciclarse en uno o en los dos extremos, tiene grupos metilo laterales separados por seis átomos de carbono desde el centro y cinco en el resto de la molécula. Existen numerosísimas estructuras derivadas por ciclación, hidrogenación, dehidrogenación, alargamiento o acortamiento de cadena, isomerización, migración de doble enlace, introducción de funciones oxigenadas, o combinaciones entre ellas. Una característica particular de la estructura de estos compuestos es la presencia de un sistema de dobles enlaces conjugados que actúa como cromóforo, es decir, responsable del color de la molécula, dando color amarillo, naranja y rojo a estos pigmentos (Rodríguez Amaya 2001, Britton 2009).

Debido a la presencia de estos dobles enlaces los carotenoides pueden presentarse como isómeros *cis* y *trans* (Figura 2). La configuración *cis* de un doble enlace conlleva que los dos sustituyentes de los átomos de carbono que lo conforman se sitúen en el mismo lado del doble enlace, al contrario de lo que ocurre en la configuración *trans*, en la que se sitúan en lados opuestos. En la naturaleza se encuentran principalmente con todos

los dobles enlaces configurados en forma *trans*, aunque también se pueden encontrar isómeros con configuración *cis* en alguno de los dobles enlaces de la molécula y, en otros casos, la isomerización se produce durante la manipulación por luz, temperatura o agentes químicos como ácidos, o adsorción a una superficie activa. Esta isomerización lleva a pérdida de color y, en aquellos carotenoides con actividad provitamina A, a la pérdida de dicha actividad (Rodríguez Amaya 2001).

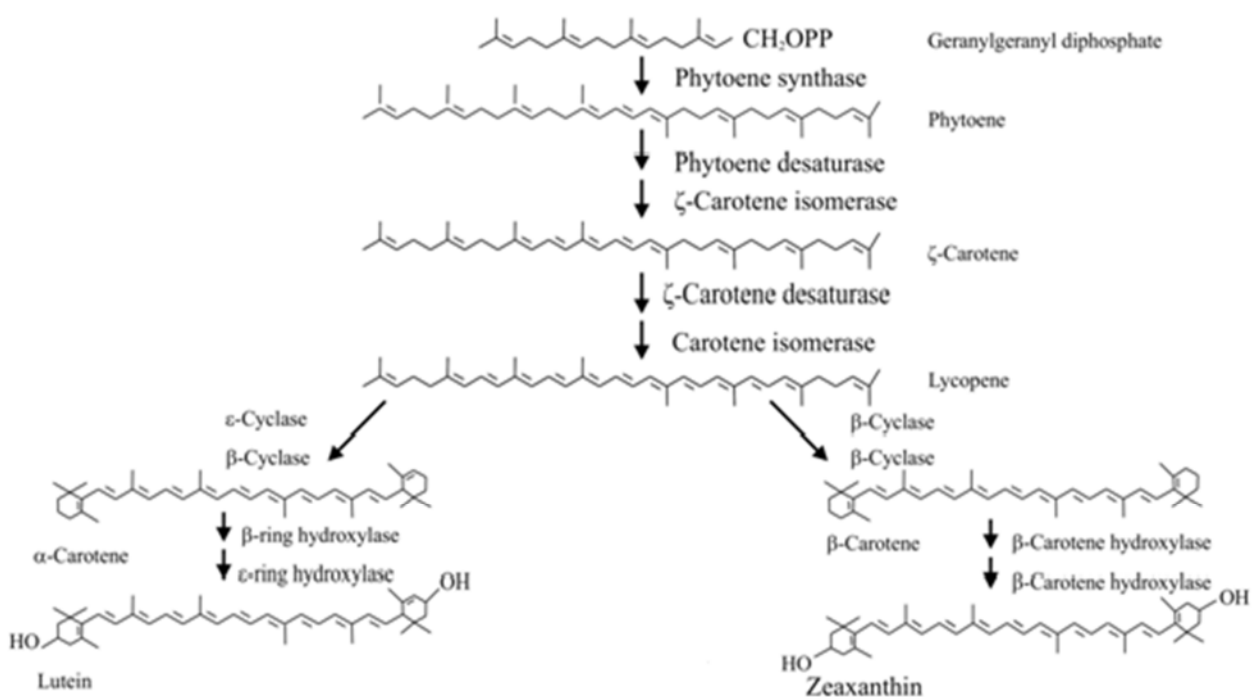


Figura 1. Ruta de síntesis de los carotenoides (Hannoufa 2011)

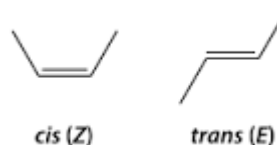


Figura 2. Ejemplo de las configuraciones *cis*- y *trans*-

Una de las posibles modificaciones que sufren los carotenoides es la introducción de funciones oxigenadas, y entre ellas está la introducción de grupos hidroxilo. La presencia o ausencia de este grupo modifica las condiciones físico-químicas de la molécula (ej. altera su solubilidad) y en base a este criterio los carotenoides se clasificarán en carotenos o xantofilas. Los primeros son compuestos hidrocarbonados y los segundos contienen oxígeno (Rodríguez Amaya 2001), por lo que pueden formar enlace con ácidos grasos constituyendo monoésteres o diésteres en función del número de grupos hidroxilo que contenga la molécula y cuántos se enlacen con ácidos grasos. En la naturaleza se encuentran tanto xantofilas libres, como esterificadas. La mayoría de las xantofilas de las frutas maduras están en forma esterificada, con algunas excepciones como aquellas frutas que permanecen de color verde al madurar (ej. el kiwi) y las xantofilas, presentes en hojas suelen encontrarse en forma libre (Rodríguez Amaya 2001).

En la figura 3 se muestra la estructura de los seis carotenoides mayoritarios en sangre de la mayoría de las poblaciones: el α -caroteno, β -caroteno y licopeno pertenecen al grupo de carotenos y la β -criptoxantina, luteína y zeaxantina al de xantofilas.

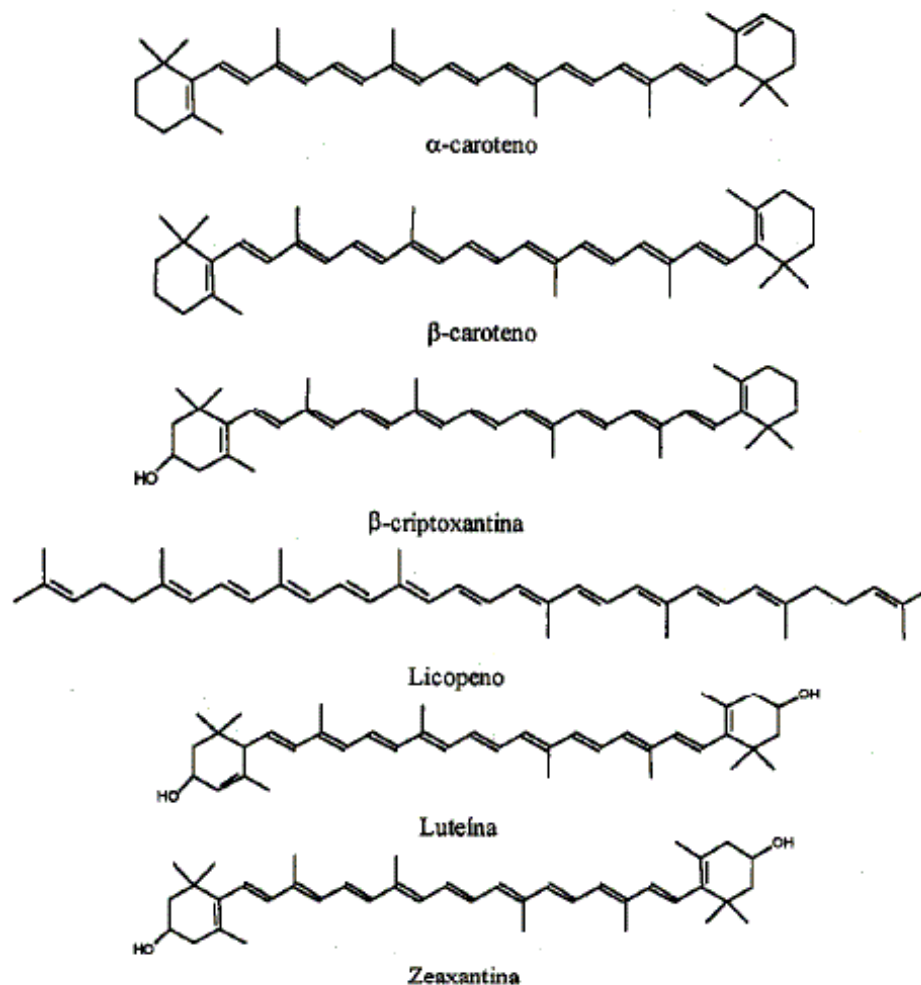


Figura 3. Estructura de los carotenoides mayoritarios en sangre.

1.2 Propiedades físico-químicas

1.2.1 Solubilidad

Los carotenoides son compuestos lipofílicos, con escasas excepciones (ej. crocina), por lo que son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como acetona, alcohol, dietil éter, cloroformo y acetato de etilo. La solubilidad difiere según sean carotenos o xantofilas de tal modo que los carotenos serán más solubles en solventes más apolares como el hexano, tolueno y éter de petróleo, y las xantofilas, en solventes más polares como

el etanol y el metanol. Es interesante destacar que los carotenoides en estado cristalino son difíciles de disolver excepto en benceno y diclorometano (Rodríguez Amaya 2001). Debido a su carácter lipofílico se encuentran en ambientes lipofílicos como son las membranas, aunque también están en ambientes acuosos por medio de asociaciones a proteínas o reacciones de glicosilación (Britton 1995).

1.2.2 Absorbancia

El sistema de dobles enlaces conjugados que, constituye el cromóforo que absorbe luz y les da a los carotenoides su atractivo color, proporciona además una buena herramienta para su identificación: su espectro de absorción ultravioleta-visible. Las longitudes de onda de máxima absorción así como la forma de su espectro, son característicos de cada cromóforo (Figura 4). La mayoría de los carotenoides presentan espectros de tres picos al tener máximos de absorción a tres longitudes de onda. Las características estructurales de cada uno de los carotenoides como ciclación, introducción de grupos hidroxilo y metoxilo y la formación de epóxidos, así como el número de dobles enlaces conjugados son las causas de las diferencias entre sus espectros. Éstos también varían en función del solvente en el que se encuentre disuelto el carotenoide. Las longitudes de onda a las que se producen los máximos en hexano, éter de petróleo, dietil éter, etanol, metanol y acetonitrilo son muy semejantes pero varían 2-6 nm en acetona, 10-20 nm en cloroformo y en diclorometano y entre 18 y 24 nm en tolueno. Estas variaciones debidas al solvente deben tenerse en cuenta en el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (High-performance liquid chromatography) con detección por red

de fotodiodos y utilizando fase móvil en gradiente, ya que la composición del solvente puede ir variando a lo largo del tiempo (Rodriguez Amaya 2001).

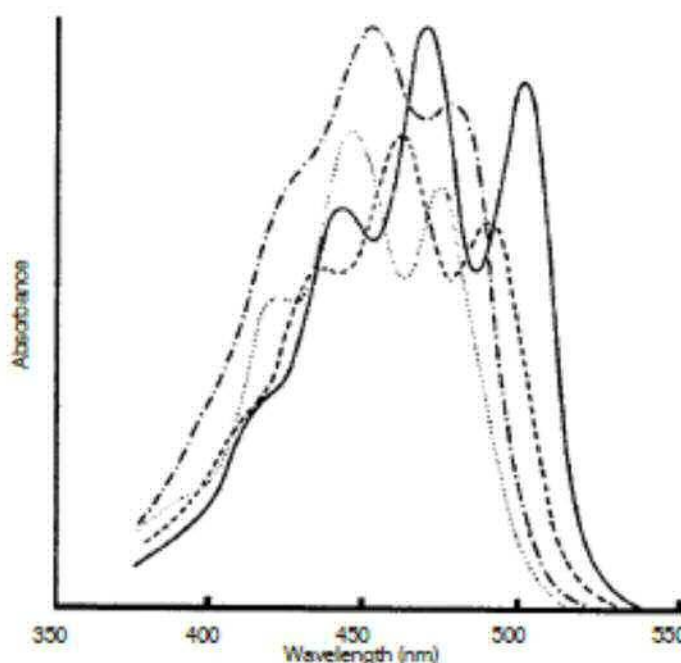


Figura 4. Espectro de absorción en el visible de licopeno (—), γ -caroteno (----), β -caroteno (-.-.-.) y α -caroteno (.....) en éter de petróleo.

Los carotenoides en solución obedecen a la Ley de Lambert-Beer, su absorbancia es directamente proporcional a su concentración, por ello, pueden ser cuantificados espectrofotométricamente relacionando la absorbancia a una determinada longitud de onda con el valor del coeficiente de absorción $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ (absorbancia teórica de una disolución de concentración al 1% (peso /volumen) en una cubeta de 1 cm de paso de luz) o el coeficiente de absorción molar (absorbancia teórica de una disolución

de concentración 1 molar) (Tabla 1). Este procedimiento carece de especificidad. Debido a la dificultad metodológica de obtención de dicho coeficiente, en ocasiones existen diferentes valores para un mismo carotenoide en un mismo solvente, lo que puede causar gran parte de la variación en los resultados analíticos (Rodríguez Amaya 2001).

	$A^{1\%}_{1cm}$	λ (nm)	solvente
α -Caroteno	2710	445	Hexano
β -Caroteno	2592	450	Hexano
β -Criptoxantina	2460	450	Hexano
Luteína	2550	445	Etanol
Licopeno	3450	470	Hexano
Zeaxantina	2480	450	Hexano

Tabla 1. Longitud de onda de máxima absorción [λ (nm)] y coeficiente de extinción ($A^{1\%}_{1cm}$) de los carotenoides mayoritarios en sangre (Scott 2001).

1.2.3 Inactivación de especies reactiva de oxígeno

La mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a un exceso en la generación de radicales libres producidos en las reacciones que en las células tienen lugar en presencia de oxígeno. Un radical libre es una molécula o átomo que tiene un electrón desapareado en el orbital más externo de su configuración electrónica. Una de las principales especies reactivas de oxígeno es el oxígeno singlete (1O_2), que se produce por la absorción de energía por parte de un electrón de la molécula de oxígeno (O_2), lo que supone el paso de su estado fundamental u oxígeno triplete (3O_2), al estado excitado u oxígeno singlete (1O_2). Esta

especie es capaz de dañar moléculas biológicas incluyendo proteínas, enzimas y ADN, estando implicada en numerosas patologías (Di Mascio *et al.* 1990). El mejor ejemplo de actividad antioxidante de los carotenoides es su capacidad de *quenching* o inactivación esos $^1\text{O}_2$. El mecanismo mayoritario de inactivación por parte de los carotenoides es el físico, (las reacciones químicas entre éstos y el $^1\text{O}_2$, suponen un 0,05% de la tasa de inactivación), y consiste en el paso de energía de una molécula a otra. El $^1\text{O}_2$ transfiere su energía al carotenoide para generar el estado triplete de éste (^3CAR), y devolver al oxígeno a estado fundamental ($^3\text{O}_2$) (Krinsky *et al.* 2005): $^1\text{O}_2 + \text{CAR} \rightarrow ^3\text{O}_2 + ^3\text{CAR}$

El estado triplete del carotenoide puede volver a su estado fundamental disipando la energía mediante interacciones rotacionales y vibracionales con el solvente: $^3\text{CAR} \rightarrow \text{CAR} + \text{calor}$

Por tanto, el carotenoide permanece intacto durante la inactivación/*quenching* física del $^1\text{O}_2$ y puede ser reutilizado en sucesivos ciclos de inactivación (Stahl *et al.* 2003).

La eficacia de los carotenoides para llevar a cabo este proceso está relacionada con el número de dobles enlaces conjugados presentes en la molécula, ya que esta característica determina su nivel de energía triplete más bajo. El β -caroteno, zeaxantina, β -criptoxantina, y α -caroteno, pueden considerarse desactivadores altamente activos de $^1\text{O}_2$ y el más eficiente es el licopeno (Stahl *et al.* 2003).

2. Carotenoides en el contexto dieta salud

Los carotenoides constituyen una familia formada por más de 700 compuestos, los cuales son sintetizados por organismos fotosintéticos. En organismos superiores se localizan en tallos, raíces, flores, hojas, frutos y tubérculos. Los carotenoides presentes en organismos animales han sido adquiridos por la dieta, selectiva o no selectivamente absorbidos, acumulados y en algunos casos ligeramente modificados, ya que estos organismos no son capaces de sintetizarlos *de novo* (Rodríguez Amaya 2001). De esos centenares de compuestos, unos 50 están presentes en una dieta típicamente humana y, de ellos, son 6 los que se encuentran mayoritariamente en la sangre de la mayoría de las poblaciones: luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno y licopeno (Figura3), aunque han sido identificados 34, trece de los cuales son isómeros geométricos de sus correspondientes formas trans y ocho eran metabolitos (Khachik *et al.* 1997).

2.1 Fuentes alimentarias de carotenoides.

Los grupos de alimentos cuya ingesta aporta la mayoría de los carotenoides en la dieta son los de las hortalizas y las frutas. De los seis carotenoides mayoritarios en suero (luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno y licopeno), el que se encuentra más ampliamente distribuido entre los alimentos es el β -caroteno. El α -caroteno se encuentra en alimentos en concentraciones muy inferiores a las del β -caroteno aunque en algunos, como en la zanahoria y algunas variedades de calabaza,

hay un notable contenido de este carotenoide. El licopeno es componente mayoritario de frutas y hortalizas de pulpa roja, como la sandía o el tomate pero no está presente en mucha variedad de alimentos, aunque sí en alimentos preparados por la industria alimentaria. La presencia de β -criptoxantina destaca en numerosas frutas de pulpa naranja como melocotón, nectarina, naranja. En cuanto a la luteína es el carotenoide predominante en verduras de hoja verdes, y zeaxantina, salvo algunas excepciones, es un carotenoide minoritario en alimentos (Rodríguez Amaya 2001).

Clásicamente, el interés en el estudio de carotenoides en alimentos se centró en aquellos que aportan β -caroteno debido a que potencialmente es el que puede rendir un mayor contenido en retinol. Sin embargo, en las últimas décadas el interés en otros carotenoides con actividad provitamínica A (ej. α -caroteno y β -criptoxantina) y en otros carotenoides sin dicha actividad (ej. luteína, zeaxantina y licopeno) ha ido en aumento por sus implicaciones con diversos aspectos de la salud humana. Respecto a los alimentos como fuente de provitamina A, interesa conocer no sólo cuáles son los carotenoides con actividad provitamina A que contienen, sino también la diferente capacidad de transformación en vitamina A de cada uno de ellos (Maiani *et al.* 2009, Tang 2010, Burri *et al.* 2011). La potencial actividad provitamínica adjudicada al α -caroteno y la β -criptoxantina es la mitad que la asignada al β -caroteno debido a que, en base a sus estructuras químicas, el β -caroteno puede rendir dos moléculas de retinol (tras escisión a la mitad de su molécula) (Figura 5) y los otros dos carotenoides solamente a una. Las formas de expresar su contribución a la ingesta de vitamina A son:

Equivalentes de retinol (ER) ($\mu\text{g}/\text{día}$) = retinol + (β -caroteno/6) + (α -caroteno/12) + (β -criptoxantina/12) [Utilizado por ej. FAO/WHO 2004, Moreiras *et al.*, 2013] (WHO/FAO 2004, Moreiras *et al.* 2013).

Equivalentes en Actividad de Retinol (EAR)($\mu\text{g}/\text{día}$) = retinol + (β -caroteno/12) + (α -caroteno/24) + (β -criptoxantina/24) [Utilizado por el Institute of Medicine (EEUU)(IOM 2001).

Actualmente, la contribución de los carotenoides con actividad provitamínica A a la ingesta de vitamina A expresada como EAR está siendo cuestionada en base a las últimas investigaciones en estudios de bioaccesibilidad en alimentos y de biodisponibilidad en humanos, valorando la eficiencia de la conversión del β -caroteno de la dieta a retinol, ya que se observa una elevada variación en los factores de conversión, no sólo entre estudios sino también entre individuos en algunos estudios (Tang 2010, Burri *et al.* 2011).

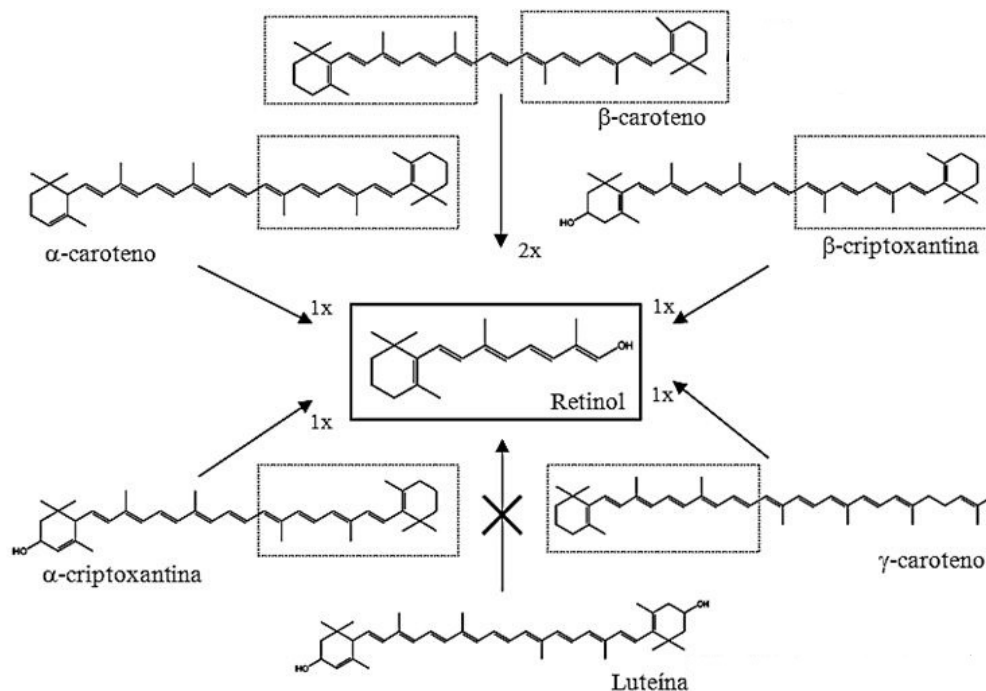


Figura5. Imagen de relación estructural entre retinol y los provitamínicos.

Datos de composición de carotenoides en alimentos de consumo en Europa, recopilados de artículos publicados en el período 2000-2007 y que recogen datos generados mediante HPLC están recopilados por Maiani *et al.* (Maiani *et al.* 2009). Entre los alimentos incluidos se encuentran las frutas, hortalizas y productos lácteos, ya que constituyen las fuentes más importantes de carotenoides en las dietas consumidas en Europa.

2.1.1 Factores que influyen en el contenido de carotenoides en frutas y hortalizas

Existen numerosos factores que influyen en el contenido en carotenoides de los alimentos como son: la variedad, la parte de la planta consumida, estado de maduración, clima o lugar geográfico de cultivo y manejo de cosecha y post-cosecha, procesado y almacenamiento (Rodríguez Amaya 2001, Maiani *et al.* 2009). Dentro de las variedades, las variaciones son mayoritariamente cuantitativas, ya que esencialmente todas las variedades contienen los mismos carotenoides. En cuanto a la parte de la planta consumida, ésta varía según la cultura culinaria de cada región, y por ello, la ingesta de carotenoides puede variar cuali y cuantitativamente.

Respecto al estado de maduración, son numerosos los estudios que han demostrado su influencia en la carotenogénesis. En la mayoría de los casos, un estado avanzado de madurez, indica un mayor contenido de carotenoides, a la vez que las clorofilas se descomponen y los cloroplastos se transforman en cromoplastos, aunque en algunas frutas, como las que deben el color de su madurez a las antocianinas, como la fresa, y aquellas

que permanecen verdes incluso maduras, como el kiwi, la concentración de carotenoides disminuye al madurar. Una vez cosechados los alimentos, la carotenogénesis continúa siempre y cuando éste siga intacto. En este punto cobran importancia las condiciones post-cosecha y de almacenado, ya que se ha observado una gran variedad en función de, por ejemplo, la temperatura de almacenado. También existe variación en función de la zona geográfica y, por tanto, el clima en el que se cultiva, ya que se ha visto que una temperatura elevada, así como una mayor exposición a la luz solar, aumenta el contenido de carotenoides (Rodriguez Amaya 2001). Finalmente, debido a la susceptibilidad a la oxidación e isomerización que tienen estos compuestos, existen numerosos factores presentes en el almacenaje que pueden derivar en un detrimento del contenido en carotenoides; la oxidación puede producirse como consecuencia de la presencia de oxígeno, metales, pro-oxidantes, enzimas, lípidos insaturados, de exposición a la luz y malas condiciones de almacenamiento. La isomerización *cis-trans* puede producirse por acción del calor y la luz.

2.1.2 Principales fuentes de carotenoides en la dieta española

Las principales fuentes alimentarias de los carotenoides provitamínicos de la dieta media española, valorada a partir de encuestas de presupuestos familiares y de encuestas de consumo de alimentos de 2004 (Granado *et al.* 2007b), son siete hortalizas y cinco frutas que contribuyen en más del 90% a la ingesta de cada uno de los principales carotenoides: hortalizas de hoja verde, zanahorias, judías verdes, patatas, tomates, plátanos, naranja, melocotón, mandarina y sandía. Más concretamente, el alimento que aporta prácticamente el 100% de α -

caroteno es la zanahoria; los que aportan una mayor cantidad de β -caroteno son: zanahoria, tomate y verdura de hoja verde mientras que la naranja y la mandarina son las principales fuentes de β -criptoxantina. En cuanto a los carotenoides no provitamínicos, los alimentos que aportan mayor cantidad de luteína son: las verduras de hoja verde, las judías verdes, lechuga, patata y naranja, coincidiendo en parte con los que suponen mayor aporte de zeaxantina, en orden de mayor a menor aporte: naranja, pimiento (tanto rojo como verde), patata y verdura de hoja verde. Por último, las fuentes que suponen prácticamente el 100% de ingesta de licopeno de la dieta media española son dos: tomate y sandía (Granado *et al.* 2007b).

2.2 Absorción y metabolismo

2.2.1 Absorción

El proceso de absorción comprende varias etapas: digestión de la matriz, dispersión en las partículas de emulsión lipídica, formación de micelas con sales biliares, transporte a través de la capa acuosa estática (“unstirred water layer”, de unos 40 μm de grosor en la superficie del epitelio intestinal) hacia el interior de las células del epitelio intestinal, empaquetamiento de los carotenoides en los quilomicrones dentro de dichas células y, por último, transporte por plasma de los carotenoides o sus metabolitos.

Antes de ser absorbidos, los carotenoides son sometidos a un proceso digestivo y han de pasar de la matriz alimentaria a la fase micelar en el intestino delgado. Para ello son liberados durante la digestión pasando

a formar parte de una emulsión. La localización de los carotenoides en esta emulsión difiere en función de si son carotenos o xantofilas ya que los primeros se encuentran en el núcleo o *core* de las gotículas lipídicas, junto con los triglicéridos, y los segundos se sitúan en la superficie de éstas. La importancia de esta localización radica en que las xantofilas podrán, espontáneamente, transferirse a las micelas, mientras que los carotenos solamente se transferirán a las micelas una vez los triglicéridos han sido hidrolizados por la lipasa pancreática dependiente de colipasa. A diferencia de la absorción de otros lípidos dietéticos, los carotenoides requieren, necesariamente, la intervención de las sales biliares para formar las micelas que permiten solubilizar en agua lo que de otra forma sería insoluble, transportándolo así hasta el borde en cepillo de las células epiteliales intestinales (Perera *et al.* 2007).

Una vez localizados en las micelas, algunos autores afirman que los carotenoides atraviesan la capa acuosa estática, donde las micelas liberan los carotenoides a la porción apical de los enterocitos (Perera *et al.* 2007). Una vez en la superficie de éstos se lleva a cabo lo que es, propiamente, la absorción. Hasta hace poco tiempo, se pensaba que esta absorción se producía por difusión pasiva (Perera *et al.* 2007), pero la absorción selectiva de los carotenoides en humanos no puede ser explicada solamente mediante mecanismos de difusión simple, por lo que se sugiere que la captación de carotenoides está parcialmente mediada por una difusión facilitada (Reboul *et al.* 2005, Kotake-Nara *et al.* 2011). Recientemente se ha determinado que este proceso es saturable, lo que indica que está facilitado por una proteína, que ha sido identificada como el receptor SR-B1 (*class B-type 1 scavenger receptor*) y está presente en diversos tejidos,

entre ellos el intestinal. Además de facilitar el transporte de carotenoides, facilita el de diferentes lípidos como tocoferol y colesterol. Dado que en ensayos, la eliminación de este receptor no elimina totalmente la absorción de β -caroteno, deben existir otros mecanismos de absorción que probablemente incluirán receptores como el CD36 (von Lintig 2010). Recientemente se ha demostrado la implicación del receptor SR-B1 también en la acumulación de los carotenoides en tejidos diana, ya que facilita la captación de aquéllos en las células epiteliales pigmentadas de la retina en humanos; dichas células aportarán los carotenoides necesarios a la retina. Sin embargo su acumulación en esta localización está mediada por otras proteínas específicas de unión a carotenoides como la *zeaxanthin-binding protein* (von Lintig 2010).

Diversos estudios epidemiológicos y clínicos han mostrado una gran diferencia de absorción de carotenoides entre individuos. Estas diferencias pueden ser explicadas por: la estructura del carotenoide en concreto, la naturaleza del alimento que contiene el carotenoide, diversos factores exógenos como la ingesta de medicamentos u otros componentes susceptibles de interacción, factores genéticos del sujeto así como su estatus nutricional (Perera *et al.* 2007, Thurnham 2007a, Maiani *et al.* 2009).

2.2.2 Metabolismo

Los carotenoides, una vez liberados en el lumen del intestino, se distribuyen en la fase lipídica y se absorben por mecanismos iguales a los de las grasas: son disueltos en la grasa micelar y transportados a los

enterocitos que recubren la pared intestinal, en las micelas (Figura 6). A medida que la grasa se reprocesa dentro de los enterocitos y se forman los quilomicrones, los carotenoides se liberan y algunos son objeto de la acción de la β -caroteno 15,15' dioxigenasa. El producto inicial es el retinaldehído, que es convertido en retinol, posteriormente esterificado (principalmente con ácido palmítico) e incorporado en los quilomicrones como palmitato de retinol. Algunos de los carotenoides provitamina A restantes y de los carotenoides sin dicha actividad también son incorporados en los quilomicrones, mientras que otros permanecen en la mucosa y son eliminados a través de las heces. Los quilomicrones son transportados vía linfática a la circulación sanguínea y son captados por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y liberados al torrente sanguíneo (Thurnham 2007a). Una vez que son degradados por la acción de la *lipoprotein lipasa*, los carotenoides presentes en los quilomicrones remanentes son captados por el hígado, donde son almacenados o re-secretados en las VLDL a la sangre y posteriormente distribuidos en las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Finalmente, los carotenoides son captados por los tejidos mediante los receptores de LDL. Aquellos muy hidrofóbicos, como el β -caroteno y el licopeno, están localizados en la parte interna de las LDL, mientras que los menos hidrofóbicos, las xantofilas (ej. luteína y zeaxantina) se distribuyen por igual en las LDL y las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y se encuentran localizadas en la parte externa de las partículas de lipoproteínas (Krinsky *et al.* 2005, Perera *et al.* 2007, Kotake-Nara *et al.* 2011). Esta distribución no se ve afectada por una elevada ingesta a partir de suplementos ni por periodos de ausencia de ingesta dietética (Perera *et al.* 2007).

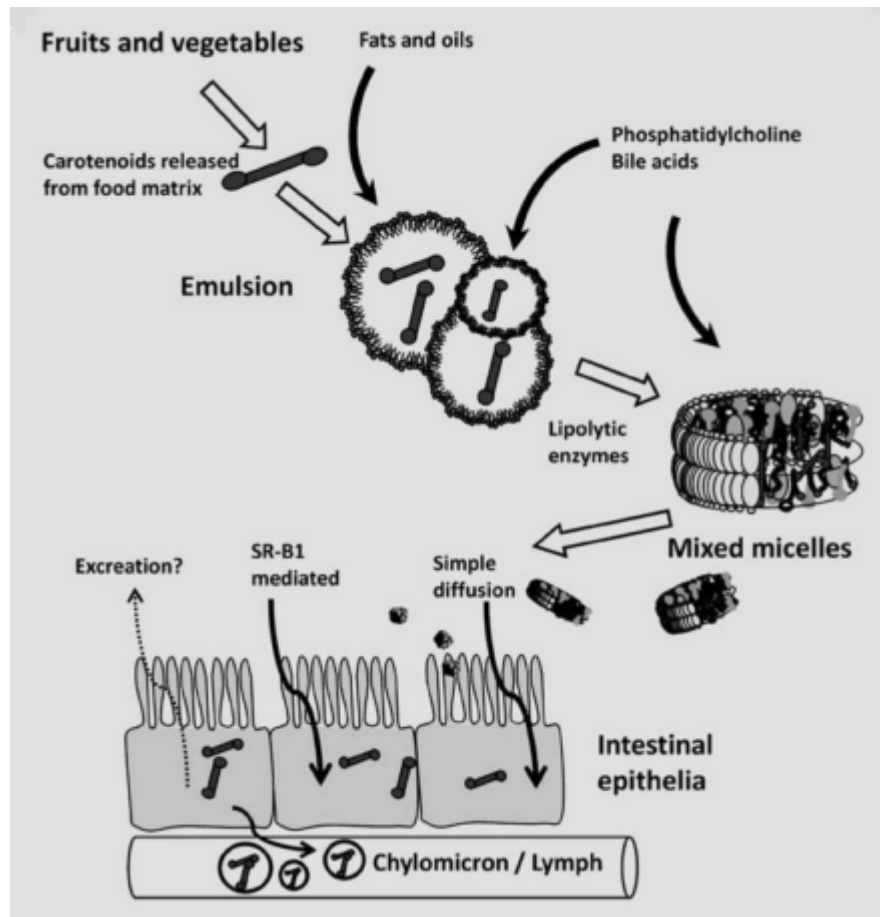


Figura 6. Proceso de absorción de los carotenoides (Nagao 2011).

El metabolismo de la vitamina A a partir del β -caroteno comienza con la rotura simétrica de éste, por una enzima llamada β,β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) en el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal (figura 7). Esta rotura se produce en el enlace entre las posiciones 15 y 15' de la cadena carbonada, obteniéndose como resultado dos moléculas de retinaldehído (IOM 2001). Esta enzima solamente actúa sobre un número limitado de carotenoides, al contrario que la β,β -caroteno 9,10-dioxigenasa (BCDO2) que produce una rotura asimétrica entre las posiciones 9' y 10' y tiene una especificidad más amplia (Perera *et al.* 2007, Perusek *et al.* 2013). Estudios en ratones BCMO1 *Knockout* demuestran que la BCDO2 no puede compensar la disminución en la producción de vitamina

A probando que las actividades de las dos oxigenasas no se solapan (Perusek *et al.* 2013).

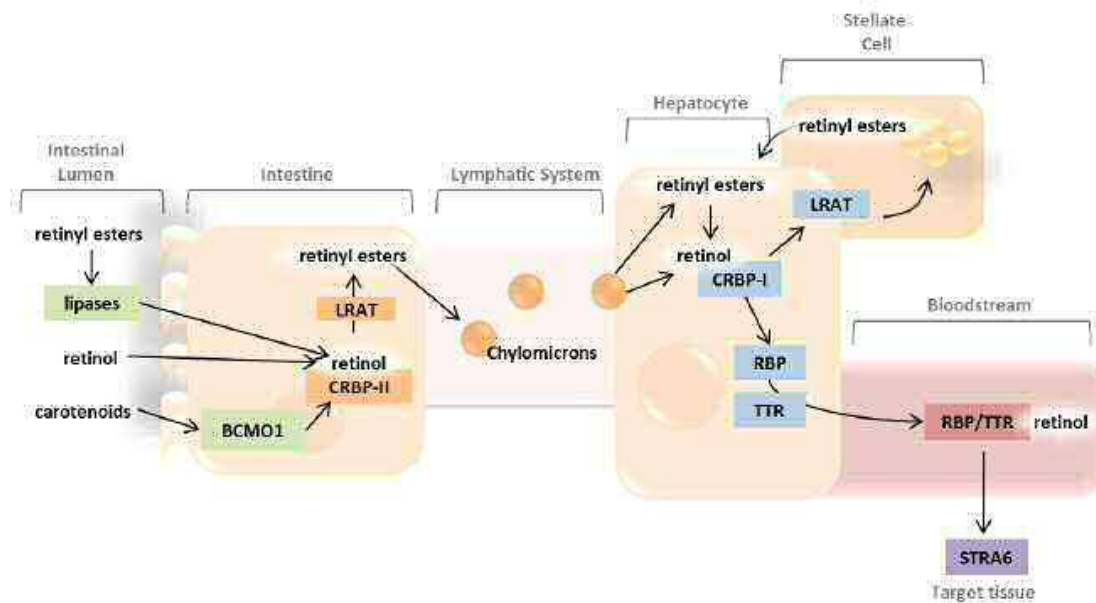


Figura 7. Metabolismo de carotenoides y retinoides (Perusek *et al.* 2013).

2.3 Actividad biológica

Tradicionalmente los estudios que relacionaban la ingesta de carotenoides con la salud se centraban en su ingesta para la prevención de enfermedades carenciales, concretamente, en la actividad provitamínica A y principalmente del β -caroteno. En los últimos años cada vez son más los estudios que buscan la relación de los carotenoides de manera individual con beneficios para la salud pero ya no como búsqueda de ausencia de déficit, sino como búsqueda de una salud óptima. Algunos de estos beneficios para la salud son mejora de la función inmune, protección frente a quemaduras solares, inhibición del desarrollo de ciertos tipos de cáncer

(Maiani *et al.* 2009) reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer (Al-Delaimy *et al.* 2005) y otras enfermedades degenerativas (Krinsky *et al.* 2005, Perera *et al.* 2007). Pero debido al objeto que nos ocupa, en este apartado nos centraremos concretamente en aquellas que tienen relación con la visión.

2.3.1 Actividad antioxidante

En el cuerpo humano, como resultado del metabolismo normal, se producen una serie de sustancias oxidantes: los radicales libres y el oxígeno singlete, que son responsables de daños celulares, en el ADN y en proteínas. Este daño oxidativo está implicado en los procesos de envejecimiento y en el origen y desarrollo de diversas enfermedades degenerativas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, alteraciones del sistema inmune, cataratas y degeneración macular asociada a la edad (DMAE)(Rodríguez Amaya 2001, Krinsky *et al.* 2005, Britton 2008, Kopsell *et al.* 2009). Algunas sustancias, entre las que se encuentran los carotenoides, tienen la capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno debido a las propiedades estructurales de sus moléculas que incluyen dobles enlaces conjugados; concretamente algunos autores los señalan como unos de los neutralizadores biológicos de especies reactivas de oxígeno más potentes(Britton 2008, Kopsell *et al.* 2009). **(Tabla 2)** A raíz de estas afirmaciones, existen numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que tratan de evaluar la capacidad antioxidante de los carotenoides. Sin embargo, tanto la inespecificidad de los métodos de medición como la

variabilidad del contenido de carotenoides de los alimentos y la influencia sobre los resultados del estatus nutricional de los sujetos participantes en los estudios, dificultan la interpretación de datos (Kopsell *et al.* 2009, Rodriguez-Amaya 2010).

POSIBLES REACCIONES DE LOS CAROTENOIDES CON RADICALES (R [•])	
Formación de aductos	$CAR + R^{\bullet} \rightarrow R-CAR^{\bullet}$
Transferencia de electrones	$CAR + R^{\bullet} \rightarrow CAR^{\bullet+} + R^{-}$
Abstracción de hidrógeno alílico	$CAR + R^{\bullet} \rightarrow R-CAR^{\bullet} + RH$

Tabla 2. Tres posibles reacciones de los carotenoides con radicales (R[•]) (Krinsky *et al.* 2005).

Entre los tejidos sobre los cuales resulta fundamental la acción antioxidante de los carotenoides se encuentra la retina. La retina es una zona muy susceptible al estrés oxidativo por su elevada exposición a la luz, su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados que -debido a las estructuras moleculares densas en electrones- son susceptibles a la oxidación y su gran actividad metabólica causada por una elevada vascularización y por los numerosos procesos de fagocitosis que se llevan a cabo en el epitelio pigmentario (es el tejido con mayor metabolismo de oxígeno entre los mamíferos) (Beatty *et al.* 2000). Como mecanismo de defensa, la retina tiene varias opciones: las enzimas con capacidad antioxidante (catalasa, peroxidasa, minerales implicados en estas enzimas como zinc, selenio, manganeso y cobre) y, por otro lado, diversos

compuestos de origen dietético entre los que se encuentran los carotenoides (Olmedilla Alonso 2007). En la mácula (Figura 8) se acumulan, selectivamente y en mayor concentración que en el resto del organismo, dos carotenoides dietéticos: la luteína y la zeaxantina, así como otro carotenoide formado en la retina a partir de la luteína llamado mesozeaxantina.

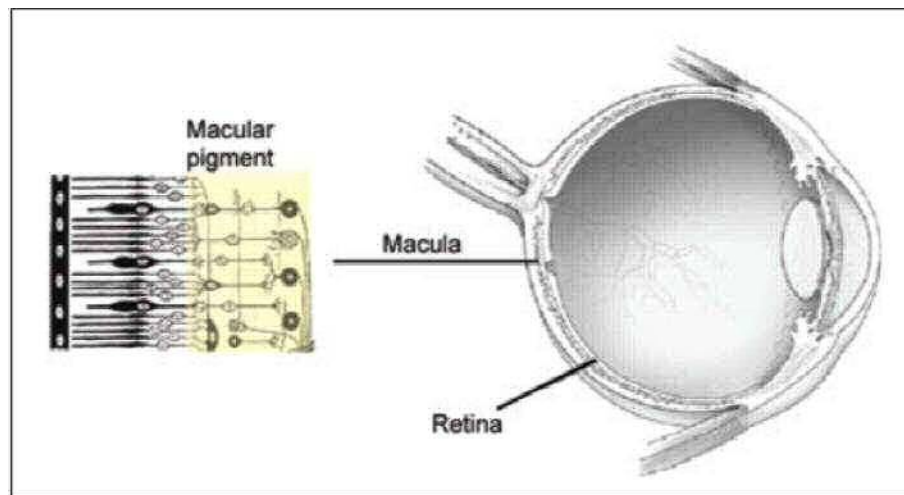


Figura 8. Esquema que muestra una sección transversal del ojo en el que se señala la retina y la mácula (Stringham *et al.* 2010).

2.3.2 Filtro de luz azul.

La energía lumínica, especialmente en combinación con oxígeno, puede ser muy dañina causando deterioro en células y tejidos por medio de oxígeno singletes y radicales libres. Entre las diversas longitudes de onda,

una de las zonas más dañinas es la que corresponde a la luz azul, porque contiene una mayor energía. Los carotenoides, cuyo espectro de absorción coincide con la zona azul del espectro visible (**Figura 9**), pueden actuar como filtro absorbiendo el exceso de energía. Este tipo de protección está presente en tejidos fotosintéticos de las plantas así como en la retina, lo que lleva a sugerir que el pigmento macular, constituido por luteína y zeaxantina, sirve para proteger los fotorreceptores presentes en esta zona, que son extremadamente sensibles frente a la luz de longitudes de onda corta (Britton 2008, Murray 2014).

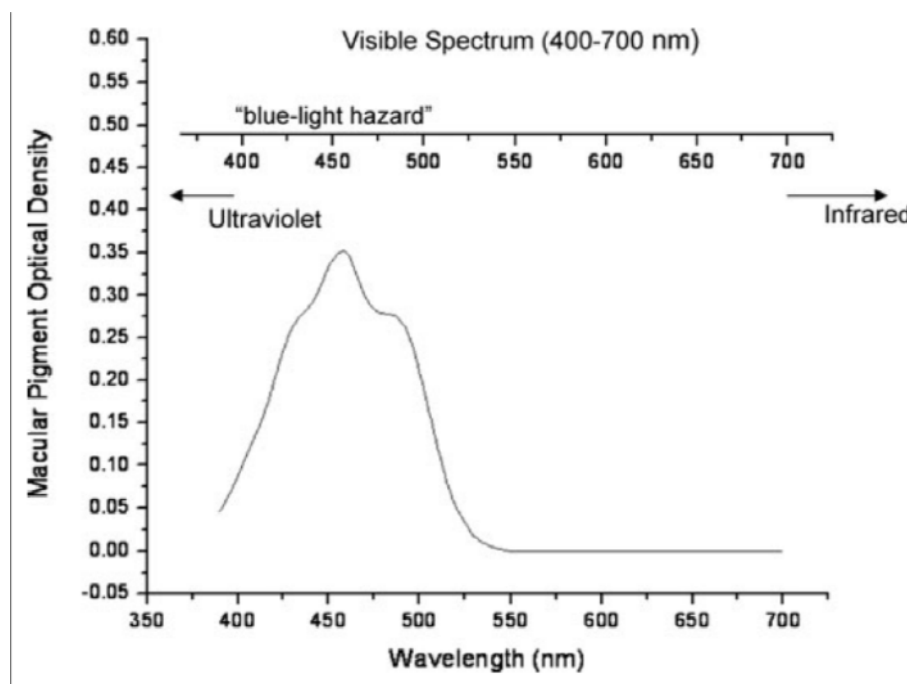


Figura 9. Espectro de absorción de luteína y zeaxantina de la retina (de Bone *et al.*, 1992) comparado con el espectro visible (Stringham *et al.* 2010).

2.3.3 Precursores de retinol

La vitamina A es un nutriente esencial implicado en el crecimiento y desarrollo, la respuesta inmune, la reproducción, el mantenimiento de tejidos y la función visual (IOM 2001, WHO/FAO 2004, Perusek *et al.* 2013, Burri 2015, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015). Esta vitamina puede ser ingerida como retinol preformado a partir, únicamente, de alimentos de origen animal y como carotenoides provitamínicos, de origen fundamentalmente vegetal, de forma que éstos se transforman en retinol, una vez en el organismo. Los carotenoides que poseen la capacidad de transformarse en vitamina A en el organismo han de cumplir una condición estructural: poseer un anillo β no sustituido con una cadena poliénica de 11 carbonos (Figura 5). Según cumplan o no esta condición, los carotenoides mayoritarios en sangre son clasificados en provitamínicos (β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina) y no provitamínicos (luteína, zeaxantina y licopeno).

El retinol es una molécula esencial para el ciclo visual ya que es transformado en la capa más externa de la retina humana en 11-*cis*-retinaldehído (Figura 10), que constituye el pigmento visual al unirse a lipoproteínas. Con la absorción de un fotón de luz, el 11-*cis*-retinaldehído se isomeriza a todo-*trans*-retinaldehído, dando comienzo al proceso de transducción de la señal visual. La regeneración del 11-*cis*-retinaldehído es llevada a cabo por una serie de reacciones enzimáticas específicas, completándose así el ciclo visual (IOM 2001, Saari 2012).

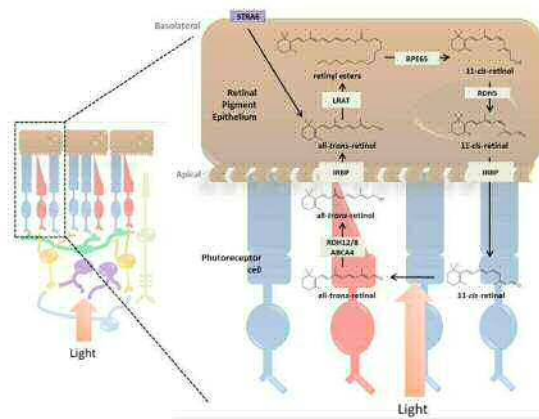


Figura 10. Absorción de luz por los pigmentos visuales produce la fototransducción (Perusek *et al.* 2013).

3. Los carotenoides de la dieta en la salud ocular

La visión es uno de los sentidos fundamentales en la interacción con el mundo que nos rodea y, por tanto, la capacidad visual de cada individuo, que depende de múltiples factores (físicos, fisiológicos y psicológicos), va a influir claramente en la calidad de vida de éste. La visión es el proceso por el cual las imágenes procedentes del mundo externo son interpretadas por el área visual del cerebro. La retina es la parte del sistema visual que facilita la transformación de la luz en señal eléctrica que llega al cerebro. El ciclo visual es una reacción enzimática secuencial del todo-*trans*-retinol (vitamina A) que ocurre en la capa externa de la retina y es esencial para el mantenimiento de la visión. Por otra parte, el polo posterior de la retina, que recibe el nombre de mácula y su zona central, la fovea, tiene la mayor concentración de conos (células fotosensibles) y es responsable de la visión central en detalle y del color. En la mácula se encuentran tres carotenoides, la luteína, la zeaxantina y la mesozeaxantina, que en conjunto reciben el nombre de pigmento macular (Loskutova *et al.* 2013). La presencia del retinol y de la luteína y la zeaxantina depende de su aporte dietético; el retinol puede ser obtenido como tal y también a partir de carotenoides con actividad provitamina A (β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina), en cambio la mesozeaxantina es formada en la retina a partir de la luteína.

3.1 Carotenoides provitamínicos

Las funciones de la vitamina A se localizan en la retina (en el ciclo visual) y en todos los tejidos del cuerpo donde sistemáticamente mantiene

el crecimiento y la salud de las células. En el ciclo visual, la rodopsina, pigmento crítico para la visión en luz tenue, se forma en las células fotorreceptoras (bastones) tras la conversión del todo-*trans*-retinol a retinaldehído, isomerización de la forma 11-*cis*, y unión a la opsina. La velocidad con la que la rodopsina se regenera está relacionada con la disponibilidad de retinol (WHO/FAO 2004, Saari 2012, Perusek *et al.* 2013). La ceguera nocturna es habitualmente un indicador de deficiencia de retinol, pero también puede ser debida al déficit de otros nutrientes críticos para la regeneración de la rodopsina (ej. proteína y zinc) y de otras enfermedades congénitas (ej. retinitis pigmentosa) (WHO/FAO 2004, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015). Por otra parte, el crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales del organismo también se encuentran afectados en caso de deficiencia de vitamina A, con la consiguiente disminución de secreción mucosa y la pérdida de integridad celular que reducirán la capacidad de defensa del organismo frente a patógenos. Los síntomas clínicos de estos cambios en el ojo son la xerosis (sequedad) y descamación de las células de la superficie (xeroftalmía) y finalmente la ceguera (WHO/FAO 2004, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015). En estadios iniciales los síntomas se pueden corregir administrando retinol o carotenoides provitamínicos (β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina) (IOM 2001, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015).

Una de las poblaciones en las que esta deficiencia supone un riesgo más grave es la infantil y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 190 millones de niños en edad preescolar y 19 millones de mujeres gestantes sufren en el mundo deficiencia de vitamina A (WHO 2009). Las

primeras consecuencias de esta deficiencia en las etapas iniciales de la vida son el crecimiento intrauterino y post-natal retardado, así como un amplio abanico de enfermedades congénitas conocidas como el síndrome de deficiencia de vitamina A. En adultos se manifiestan además con disfunciones en la función visual, en el sistema inmune, en la reproducción y, en algunos casos, provocando anemia (anemia ferropénica dependiente de vitamina A) (WHO/FAO 2004, Kopsell *et al.* 2009, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015).

3.1.1 Recomendaciones de ingesta de vitamina A y de carotenoides provitamina A

La adecuación de la ingesta dietética de una persona o población se obtiene al comparar ésta con las recomendaciones de ingesta que emiten o adaptan, en cada país, diversos organismos científicos o de salud pública. En los estudios nutricionales realizados en España se han utilizado recomendaciones procedentes de diversas fuentes, ej. Moreiras *et al.* (Moreiras *et al.* 2013), el *Institute of Medicine* (IOM)(IOM 2001), la *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) y la OMS (WHO/FAO 2004) y recientemente se publicaron las recomendaciones emitidas por la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD)(FESNAD 2010) que implicaban el acuerdo de numerosas sociedades españolas. El uso de unas y otras conlleva la utilización de diferentes cantidades que son obtenidas en base a criterios diferentes (ej. ingesta de seguridad recomendada, ingesta poblacional de referencia, etc) y también en diferentes unidades, (tabla 3) lo que dificulta la comparación entre estudios.

	NCM	D-A-CH	OMS/ FAO	AFSSA	SCF	NL	DH	FESNAD*	Moreiras <i>et al</i> *	IOM*	FAO *
IR hombres	900	1000	600	800	700	1000	700	700	1000	900	600
IR mujeres	700	800	500	600	600	800	600	600	800	700	500
Unidades	µg ER/día	µg ER/día	µg ER/día	µg ER/día	µg ER/día	µg ER/día	µg ER/día	µg ER/día	µg ER/día	µg EAR/día	µg ER/día

(** Recomendaciones ampliamente utilizadas en España); NCM: Consejo Nórdico de Ministerios (Países Nórdicos); D-A-CH: Alemania, Austria, Suiza; OMS/FAO (Mundial); AFSSA: Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria (Francia); SCF: Comité científico de alimentación que asesora a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Europa); NL: Países bajos; DH: Departamento de Salud de Reino Unido (Reino Unido). FESNAD (España); Moreiras *et al* (España); IOM (EEUU y Canadá); FAO (Naciones Unidas).

Tabla 3 Recomendaciones de ingesta de Vitamina A de diversos países y organismos internacionales (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015)

Actualmente no existen recomendaciones de ingesta individualizada para los carotenoides provitamina A, sino que se valora su contribución a la ingesta total de vitamina A. Hasta hace relativamente pocos años, la ingesta de vitamina A a partir de carotenoides provitamínicos se expresaba en ER, considerando que la actividad vitamínica A del β -caroteno era 1/6 y el α -caroteno y β -criptoxantina 1/12 de la de la vitamina A (NRC 1980, 1989). Estos factores se obtuvieron, inicialmente, basándose en los datos de Sauberlich (Sauberlich *et al.* 1974) de cantidad necesaria para corregir una adaptación a la oscuridad anormal en individuos con deficiencia de vitamina A, en los que se determinó que el ratio de actividad del retinol frente al β -caroteno era 1:2. Posteriormente se estableció que la eficiencia de absorción de este carotenoide a partir de la dieta era de un 33%, frente a β -caroteno purificado en aceite (forma utilizada para el anterior estudio), por lo que la equivalencia pasó a ser 1:6 (NRC 1989). Sin embargo, en los últimos años, se ha implantado la expresión en EAR que consideran que el

aporte de los carotenoides provitamínicos es la mitad que en los ER, es decir 1/12 y 1/24. Este cambio ha venido provocado por datos recientes que muestran que la actividad provitamínica A del β -caroteno obtenido a partir de la dieta es un sexto, en lugar de un tercio, de la del β -caroteno purificado en aceite(IOM 2001) y, al ser los otros dos carotenoides provitamínicos, α -caroteno y β -criptoxantina, capaces estructuralmente de producir la mitad de moléculas de retinol que el β -caroteno se consideró que el ratio de conversión de éstos es de 1/24. Sin embargo la FAO mantiene la expresión de ER, en la que la equivalencia de β -caroteno es de 1/6 y la de los otros carotenoides con actividad provitamina A es 1/12.

Debido a la naturaleza potencialmente tóxica de la vitamina A (únicamente en forma de retinol), es importante considerar los límites máximos de consumo sin que exista riesgo para la salud. De acuerdo a la *European Food Safety Authority* (EFSA) el nivel máximo permitido de ingesta de vitamina A, basado en el riesgo de hepatotoxicidad y teratogenicidad, es de 3 000 μg ER/ día para mujeres en edad fértil y hombres; sin embargo, dado que los datos disponibles no aportan una suficiente evidencia de causalidad, no está establecido el máximo nivel de ingesta tolerable (IOM 2000, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015). Los carotenoides provitamina A no han mostrado toxicidad cuando se ingieren a partir de fuentes naturales en la dieta, siendo solo la carotenodermia (coloración amarillenta de palmas y plantas de pies) el efecto de una ingesta excesiva (reversible al disminuir la ingesta) (Willett *et al.* 1983).

3.2 Luteína y zeaxantina

En la dieta se encuentran presentes más de 50 carotenoides pero sólo hay constancia de que se absorban, aproximadamente, una cuarta parte de ellos que están por tanto disponibles para ser utilizados por el organismo. De éstos, sólo luteína y zeaxantina se encuentran en la mácula mostrando una acumulación preferente en la zona de visión más fina, por lo que se considera que existe un mecanismo de captación selectivo implicado que responde según las necesidades del tejido (la mácula) (figura 8). El pigmento macular facilita el desarrollo visual en el ojo sano al absorber la luz azul y por tanto atenuar la aberración cromática que esta produce, así como también el impacto adverso de la dispersión de la luz. Por otra parte, el pigmento macular podría proteger frente al desarrollo de la DMAE por las mencionadas razones y por su actividad antiinflamatoria y antioxidante.

La DMAE afecta a la mácula produciendo pérdida de la visión central y es, además, la principal causa de ceguera total, irreversible, en población mayor de cincuenta años en el mundo occidental siendo, a pesar de ello, una enfermedad bastante desconocida por la población (Olmedilla Alonso 2007). En general hay dos manifestaciones de la DMAE: la forma seca o atrófica (la más frecuente, el 85-90% de los casos), que puede ser resultado del adelgazamiento de los tejidos maculares debido a la edad, de una sedimentación del pigmento de la mácula, o de una combinación de ambos procesos, y la forma húmedo exudativa o neovascular (la más grave), en la que crecen nuevos vasos sanguíneos debajo de la retina, que permiten salida de sangre y fluidos, provocando la muerte de células de la retina y crea puntos de pérdida en la visión central. La forma seca de la degeneración macular provoca en sus inicios, a menudo, visión ligeramente borrosa pero, a medida que la enfermedad progresa, el centro de la visión

se hace cada vez más borroso y la zona afectada va aumentando. El origen de la DMAE es multifactorial y sobre su etiología hay diversas hipótesis, en general no excluyentes, como son la hipótesis oxidativa, el deterioro de la membrana de Brunch, la insuficiencia vascular (en la circulación coroidal) y la hipótesis genética (Olmedilla Alonso 2007). En él están implicados, en general, muchos factores de riesgo, algunos de los cuales son modificables. Ejemplo de estos son los factores ambientales (consumo de tabaco, exposición a la luz solar...), algunos componentes de la dieta, aspectos cardiovasculares (hipertensión, hipercolesterolemia), y la obesidad. Entre los factores no modificables se encuentran la edad y los factores genéticos.

Un aumento en la ingesta de luteína y zeaxantina se asocia con un incremento de la densidad de pigmento macular (Cardinault *et al.* 2003, Beatty *et al.* 2004) que, a su vez, está asociada a menor riesgo de DMAE (Murray 2014). No está definido si la protección que ejercen los carotenoides frente a esta enfermedad se debe a que actúan como filtro, protegiendo frente a la dañina luz azul que posee una alta intensidad, por su acción antioxidante dado que es una zona muy susceptible de oxidación, debido a su alta vascularización y su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados, o a la combinación de ambas (Olmedilla Alonso 2007, Britton 2008, Kopsell *et al.* 2009).

3.2.1 Recomendaciones de ingesta de luteína y zeaxantina

Actualmente no hay recomendaciones para multitud de componentes de la dieta (ej. carotenoides, flavonoides) que probablemente, pero no de forma definitiva, son responsables de acciones

beneficiosas para el organismo humano. Sin embargo, a pesar de no haber ingestas de referencia para la mayoría de los carotenoides, incluidos luteína y zeaxantina, hay datos suficientes para recomendar un aumento del consumo de frutas y hortalizas (IOM 2000), el grupo de alimentos que aporta la casi totalidad de estos compuestos en la dieta. La luteína y la zeaxantina no cumplen los criterios para ser considerados nutrientes esenciales, ya que no han mostrado ser necesarios para el crecimiento, la salud y supervivencia y, por otra parte, su ausencia de la dieta o una ingesta inadecuada no parece dar lugar a una enfermedad carencial determinada y finalmente, la muerte. Pero, aunque luteína y zeaxantina no sean nutrientes esenciales, podrían cumplir los criterios para ser considerados como nutrientes esenciales con ciertas condiciones. Los tres criterios para considerar que un nutriente es condicionalmente esencial, incluyen: 1) la disminución de su concentración plasmática por debajo del rango de normalidad, 2) la aparición de anomalías químicas, estructurales o funcionales, y 3) la corrección de ambas situaciones por medio del aporte dietético del nutriente (Harper 1999, Semba *et al.* 2003).

Las recomendaciones de ingesta de luteína y zeaxantina, aunque no consensuadas por organismos científicos o de salud pública, van dirigidas al mantenimiento de la visión (o su optimización por ej. ante el deslumbramiento) y a la disminución de riesgo de DMAE (Granado *et al.* 2003). Los niveles de ingesta cuando se persigue una disminución de riesgo de enfermedades crónicas o alcanzar un estado óptimo de salud son, en general, muy variables según los diferentes estudios realizados, debido a la gran diversidad intra e interindividual en los resultados obtenidos (IOM 2000), variabilidad que se debe, tanto a factores naturales (estacionalidad)

como a aspectos metodológicos (ej. métodos de valoración de la ingesta, representatividad de la muestra, el tipo de encuesta dietética y fiabilidad de las tablas de composición de alimentos (TCA) utilizadas) (Granado *et al.* 1997a). En base a la gran cantidad de información disponible sobre contenido en alimentos y en suero, estudios epidemiológicos e *in vitro*, estudios de intervención en humanos (con diversos objetivos) se ha sugerido como ingesta recomendable aquella que permita alcanzar una concentración de luteína en suero en el rango entre 0,6 y 1,05 $\mu\text{mol/l}$ (34–60 μg luteína/dl) ya que estos niveles se han asociado con efectos beneficiosos, sin riesgo de posibles efectos secundarios (Granado *et al.* 2003). Esta concentración en sangre se puede alcanzar por medio de una ingesta media de 6 mg de luteína y zeaxantina/día, a partir de alimentos ricos en luteína así como también mediante el consumo de complementos alimenticios y de alimentos funcionales. Sin embargo, si la ingesta se realiza a partir de alimentos ricos en luteína sería deseable ingerir una mayor cantidad ya que la biodisponibilidad a partir de alimentos es variable y menor que la de los extractos (O'Neill *et al.* 2001), aunque siendo siempre inferior a 20 mg/día, que es el nivel de ingesta considerado seguro (Shao *et al.* 2006).

4. Bioaccesibilidad

Debido a que los carotenoides tienen numerosos efectos beneficiosos sobre la salud es interesante conocer no sólo su ingesta, sino también su biodisponibilidad, ya que esta determina la cantidad del componente de la dieta que nuestro organismo absorbe a partir de los alimentos y que se utiliza para las funciones corporales normales (Aggett 2010). En la biodisponibilidad de un componente de la dieta influyen diversos factores, tanto ligados al alimento como al sujeto. En su evaluación se utilizan modelos *in vivo* e *in vitro*, que permiten obtener información complementaria sobre los diversos factores que en ella influyen. Los modelos *in vivo* aportan información sobre los factores asociados al sujeto y los modelos *in vitro* sobre los asociados al alimento. Estos modelos aportan información complementaria, pero no necesariamente intercambiable (Granado *et al.* 2006). En los últimos tiempos el concepto de biodisponibilidad se asocia más a estudios *in vivo* y los estudios *in vitro* aportan información sobre la bioaccesibilidad de un compuesto a partir de un alimento durante la digestión.

La definición de bioaccesibilidad más generalizada considera que es la cantidad o fracción de sustancia que es liberada de la matriz alimentaria al tracto gastrointestinal y está disponible para ser absorbida (O'Connell *et al.* 2007, Maiani *et al.* 2009) (figura 11, flecha nº1). Aunque existen diferentes versiones según distintos autores, para algunos el concepto definido se corresponde con la digestibilidad, y por tanto, incluyen en el término de bioaccesibilidad al proceso de asimilación (captación de material

bioaccesible a través del epitelio por algún mecanismo de absorción transepitelial) (figura 11, flecha nº2) (Fernandez-Garcia *et al.* 2012). Otros autores van más allá e incluyen al metabolismo presistémico en el concepto de bioaccesibilidad (figura 11, flecha nº3) (Carbonell-Capella *et al.* 2014). Pero por lo general se entiende por bioaccesibilidad, y así se considera en este trabajo, la cantidad o fracción de sustancia que es liberada de la matriz alimentaria al tracto gastrointestinal y está disponible para ser absorbida (O'Connell *et al.* 2007, Maiani *et al.* 2009), correspondiente a la flecha 1 de la figura 11.

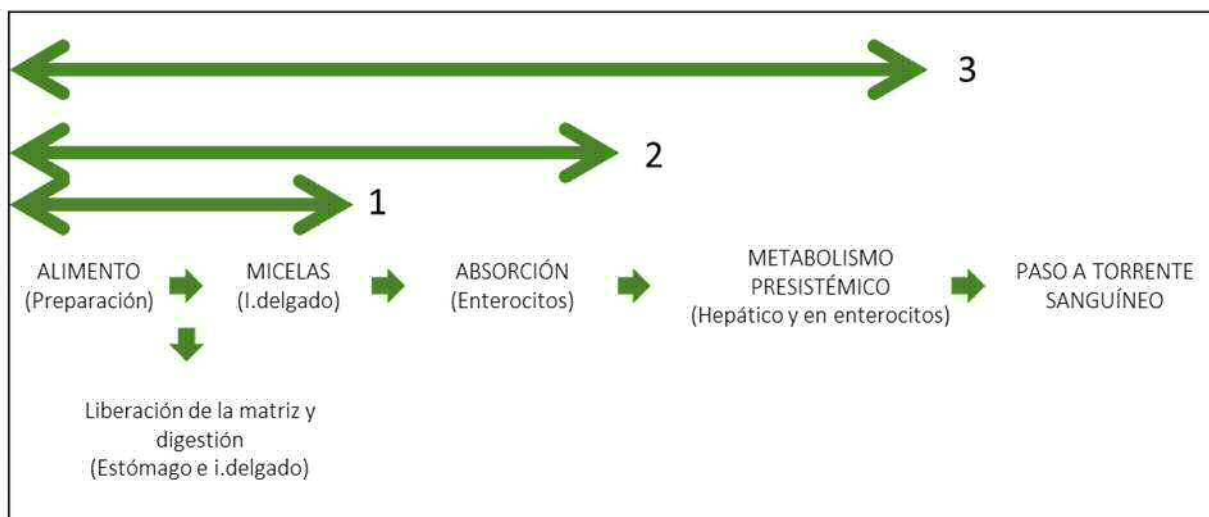


Figura 11. Esquema de las diferentes definiciones de bioaccesibilidad.

La digestión se puede simular mediante diversos tipos de modelos: *in vitro* estáticos, *in vitro* dinámicos, *in silico*, modelos humanos y modelos animales. Los modelos *in vitro* desarrollados para predecir la bioaccesibilidad de los carotenoides a partir del alimento se basan en la fisiología humana y constituyen un método simple, relativamente barato, y reproducible para estudiar su estabilidad durante la digestión, la micelarización y el transporte intestinal (Maiani *et al.* 2009). Para estos

estudios se utilizan modelos de digestión *in vitro*, y de captación celular (células Caco-2). Su valor predictivo puede ser diferente para los distintos carotenoides presentes en un alimento así como para un mismo carotenoide según el tipo de alimento en el que se encuentre (Granado-Lorencio *et al.* 2007b); además, su validez para predecir biodisponibilidad debe ser verificada en situaciones *in vivo*, ya que los resultados *in vitro* no siempre explican de forma completa las respuestas *in vivo* (Oomen *et al.* 2002, Oomen *et al.* 2003, Granado *et al.* 2006).

4.1 Descripción y comparación de métodos de digestión *in vitro*

Los protocolos de digestión *in vitro* buscan reproducir, lo más exactamente posible, las condiciones en las que se produce una digestión fisiológica. Para ello, se incluyen en el modelo las distintas fases del proceso digestivo y se desarrollan en las condiciones más similares posibles.

4.1.1 Preparación de alimento

Ésta es una etapa con muchas opciones, casi tantas como recetas de cocina y cocineros. Antes de comenzar la digestión, el alimento puede estar preparado mediante trituración, tratamiento por calor, congelación, etc... de forma aislada o en combinación con otras sustancias (grasa/otras fuentes de carotenoides). Todas estas variables del procesado del alimento que van a influir en la bioaccesibilidad, deberían estar bien definidas en los procedimientos publicados para permitir una adecuada comparación de resultados, algo que ocurre en algunos artículos, pero no en todos ellos, o con el detalle que sería oportuno. A continuación se explica el modo por el cual estos procesados influyen en la bioaccesibilidad.

La trituración del alimento rompe la estructura de la matriz alimentaria y permite la liberación de carotenoides. El grado de trituración dará lugar a diferentes tamaños de partículas. A menor tamaño de partícula del alimento, mayor superficie disponible para la acción de las enzimas digestivas, lo cual produce un aumento en la bioaccesibilidad como puede deducirse de los mayores porcentajes obtenidos al analizar la zanahoria triturada (23%) frente al análisis en pedazos (3%) para el β -caroteno con el mismo protocolo exactamente (ej. Hedren, *et al.*, 2002) (Hedren *et al.* 2002).

La temperatura, tanto por calor como por congelación, favorece la rotura de las estructuras celulares del alimento y la liberación de los carotenoides, aumentando así su bioaccesibilidad. Así, por ejemplo, en el estudio de las zanahorias mencionado anteriormente, se obtiene una bioaccesibilidad de β -caroteno de 23% para las muestras crudas frente a una de 40% para las muestras cocidas (Hedren *et al.* 2002). También se observa una tendencia a porcentajes mayores en aquellos estudios en los que la muestra fue previamente congelada (Thakkar *et al.* 2008, Bengtsson *et al.* 2009, Thakkar *et al.* 2009, Bengtsson *et al.* 2010, Svelander *et al.* 2011, Ekesa *et al.* 2012, Berni *et al.* 2014), aunque no se dispone de un estudio comparativo con/sin congelación.

El contenido y el tipo de grasa utilizada en la preparación de un alimento para su ingestión también modifican la bioaccesibilidad de los carotenoides, ya que la grasa favorece físicamente la micelarización e induce la secreción de sales biliares que también la facilitan. Así, el paso de

carotenoides del sobrenadante de la fase duodenal a la fase micelar, parece ser dependiente de la cantidad de grasa añadida (Hornero-Mendez *et al.* 2007, Ornelas-Paz *et al.* 2008, Ekesa *et al.* 2012, Failla *et al.* 2014, Pugliese *et al.* 2014) y es imprescindible para la absorción de carotenoides.

4.1.2 Masticación e insalivación-fase oral

En la digestión fisiológica la trituración se realiza en la fase oral (masticación) junto con la insalivación. En esta fase el alimento se pone en contacto con la α -amilasa.

En los ensayos de digestión *in vitro*, la muestra del alimento, previamente homogeneizado, se mezcla con una solución que contiene α -amilasa, que facilita la rotura de las estructuras amiláceas de la matriz, y se introduce en un baño con agitación a 37 °C durante un periodo de tiempo corto (entre 2 y 15 minutos) (Granado-Lorencio *et al.* 2007b, Reif *et al.* 2014) a un pH entre 6,5 y 7,0. En la bibliografía encontramos protocolos que incluyen esta fase (Granado-Lorencio *et al.* 2007b, Thakkar *et al.* 2007, Failla *et al.* 2008) y otros que la omiten (Hedren *et al.* 2002, Reboul *et al.* 2006, Hornero-Mendez *et al.* 2007, O'Connell *et al.* 2007). Resultados de diversos estudios llevan a pensar que la aplicación de esta fase aumenta los porcentajes de bioaccesibilidad, como son los de Granado-Lorencio *et al.* a partir de la zanahoria (Granado-Lorencio *et al.* 2007a) con una bioaccesibilidad de α -caroteno del 72,0% y de β -caroteno de 75,4%, frente a los de Hedrén *et al.* (Hedren *et al.* 2002) (31,5% y 33,5% respectivamente) en el mismo alimento. Sin embargo, no puede adjudicarse el incremento de bioaccesibilidad únicamente a la presencia o ausencia de la fase oral

debido a que existen otras diferencias en el protocolo, por ejemplo en la fase gástrica.

4.1.3 Fase gástrica

Cuando llega al estómago, el bolo alimenticio se pone en contacto con la pepsina y se halla en un medio con un pH muy ácido. Se inicia la liberación de los componentes de la matriz alimentaria. El tiempo de vaciado gástrico varía según el tipo de alimentos ingeridos.

La fase gástrica de la digestión *in vitro* se establece a temperatura fisiológica y con agitación continuada. Se añade ácido clorhídrico para obtener un pH bajo. En todos los protocolos se añade una solución de pepsina (generalmente porcina) y en algunos de ellos se indica la adición de mucina y de albúmina de suero bovino (Granado-Lorencio *et al.* 2007b). En general, en todos se describe un pH entre 1,5 y 3,0 (Ornelas-Paz *et al.* 2008, Reif *et al.* 2014), el tiempo de duración se sitúa entre 1 y 2 horas (Hedren *et al.* 2002, Granado-Lorencio *et al.* 2007b, Hornero-Mendez *et al.* 2007, Thakkar *et al.* 2007, Failla *et al.* 2008) con excepción de los ensayos de Reboul *et al.* (Reboul *et al.* 2006) en los que se utiliza un pH 4 durante 0,5 horas y el de Hedrén *et al.* que divide la fase gástrica en dos fracciones de 0,5 horas con pH 4 y pH 2,5 sucesivamente. La acidez y duración de esta fase parecen influir en la bioaccesibilidad final como puede deducirse de los porcentajes de bioaccesibilidad de β -caroteno a partir de espinaca obtenidos por Reboul *et al.* (18%) (Reboul *et al.* 2006) y Granado *et al.* (25%)(Granado-Lorencio *et al.* 2007a), aunque tampoco en este caso es únicamente esto lo que diferencia ambos protocolos.

4.1.4 Fase intestinal

Al llegar al intestino delgado, el quimo se pone en contacto con numerosas enzimas. El tiempo de tránsito intestinal varía según la alimentación y el sujeto.

La fase duodenal en los ensayos de digestión *in vitro* se realiza a temperatura de 37°C, con un pH entre 6 y 8 (Granado *et al.* 2006, Ekesa *et al.* 2012), durante un tiempo que varía entre 0,5 y 2,5 horas (O'Sullivan *et al.* 2010, Ekesa *et al.* 2012). Las principales diferencias entre los protocolos publicados se encuentran en las soluciones enzimáticas utilizadas, en las que, en general, se incluyen la pancreatina y las sales biliares, ya sea como extracto biliar, o como sales biliares independientes (O'Sullivan *et al.* 2010, Pugliese *et al.* 2014) y, según los autores, se añaden lipasa, colipasa, colesterol esterasa, etc. (O'Connell *et al.* 2007, Thakkar *et al.* 2007, Failla *et al.* 2008). Estas variaciones pueden dar lugar a llamativas diferencias en la bioaccesibilidad de los carotenoides, como puede observarse en estudios con diferentes concentraciones de sales biliares (Carbonell-Capella *et al.* 2014) y con diferentes concentraciones de colesterol esterasa (Chitchumroonchokchai *et al.* 2006, Granado-Lorencio *et al.* 2007a). En general, entre los distintos estudios publicados hasta el momento existen importantes diferencias, no solamente en qué enzimas o qué tipo de sales biliares son añadidas, sino también en las concentraciones utilizadas (O'Sullivan *et al.* 2010, Berni *et al.* 2014).

4.1.5 Incorporación en micelas

En el intestino, la actuación de las enzimas gástricas y las sales biliares hacen que las gotículas de grasa que han sido liberadas en las fases anteriores disminuyan de tamaño y se agrupen formando micelas. Únicamente los carotenoides englobados en micelas serán susceptibles de ser absorbidos por los enterocitos.

Para determinar la cantidad de carotenoides presente en las micelas o fase micelar, es necesario llevar a cabo la separación de ésta. Al terminar la fase duodenal se obtiene una mezcla con partículas sólidas y una fase acuosa que engloba las micelas. Las fases sólida y acuosa se separan por centrifugación en frío en la mayoría de los protocolos (Reboul *et al.* 2006, Failla *et al.* 2008, Rodrigo *et al.* 2015). En el sobrenadante están contenidas las micelas. En algunos casos los trabajos publicados consideran que el contenido en sobrenadante es la porción bioaccesible de carotenoides (Rodrigo *et al.* 2015); en otros casos someten al sobrenadante a una posterior microfiltración (0,22 μm) con el fin de eliminar los carotenoides presentes en estado cristalino, ya que éstos no serían absorbidos por los enterocitos y consideran como bioaccesible la cantidad presente después del filtrado (Failla *et al.* 2008, Bengtsson *et al.* 2009).

4.1.6 Expresión de resultados

La heterogeneidad en la expresión de resultados entre los artículos de estudio de bioaccesibilidad y la falta de concreción en algunos de ellos, dificulta sobremanera la comparación. Los resultados se encuentran expresados de diversas formas: como carotenoides en fase duodenal (sin indicar si el análisis es previo o posterior a la centrifugación), en

sobrenadante o en fase micelar (post-filtrado). Y pueden encontrarse expresados en μg de carotenoide por peso de alimento (Granado-Lorencio *et al.* 2007a) o como porcentaje (Rodríguez-Roque *et al.* 2013) sobre la cantidad del carotenoide en alimento. En ambos casos, el peso de alimento o el contenido total hacen referencia normalmente al alimento crudo o procesado, pero en algunos casos al alimento digerido (O'Connell *et al.* 2007, Kean *et al.* 2011) o incluso, en otros, no se especifica (ej. expresado gráficamente (Granado-Lorencio *et al.* 2007b)).

Cuando el estudio determina bioaccesibilidad de xantofilas, hay que tener en cuenta que, como se explica en el apartado 1 de esta introducción, se encuentran, en muchos casos, formando ésteres. Esto implica que, si se quiere conocer el contenido total de xantofilas, tanto libre como esterificadas, es conveniente someter la muestra a una saponificación, a fin de hidrolizar los enlaces éster.

4.2 Método de digestión *in vitro* estático estandarizado aplicable a alimentos. Documento de consenso internacional.

Como se ha observado a lo largo de este apartado, entre los protocolos de digestión *in vitro* para valoración de la bioaccesibilidad se observan un elevado número de diferencias tanto en las condiciones de ensayo, en los reactivos utilizados y sus concentraciones, así como en la expresión de resultados, lo que dificulta o imposibilita la comparación entre ellos, haciendo necesaria la búsqueda de un protocolo homogéneo. Esto no sólo afecta a los estudios sobre carotenoides y por ello, recientemente, se ha publicado un documento de consenso internacional presentando un

método estandarizado de digestión de alimentos (Minekus *et al.* 2014a) *in vitro*. Esta propuesta debe ser probada, y probablemente adaptada, para componentes específicos de los alimentos, como es el caso de los carotenoides. Una de las principales características del protocolo descrito es que la cantidad de enzimas utilizadas a lo largo de toda la digestión se indica en función de su actividad, en lugar de por peso pero, además, esta actividad ha de ser previamente determinada por unos ensayos concretos cuyos protocolos se describen en la información electrónica suplementaria del documento (Minekus *et al.* 2014a) (disponible también en video en *youtube* (INFOGEST 2014)). Partir de un documento de consenso permite la estandarización de las condiciones experimentales, obtener una buena reproducibilidad y repetitividad y un fácil manejo de muestras que facilite seguir las cinéticas del procedimiento. Sin embargo, hay que recordar que no se puede mimetizar la complejidad del tracto digestivo en un tubo de ensayo y que se necesita armonizar protocolos, que pueden ser algo diferentes según los tipos de compuesto en estudio.

5. Evaluación del estado nutricional

La evaluación del estado nutricional es un aspecto clave para lograr mejorar la salud a nivel individual y poblacional, ya que la dieta es uno de los factores más importantes del estilo de vida en la salud humana y es modificable; tanto la desnutrición como la sobrealimentación juegan un papel fundamental en la morbilidad y mortalidad. El estado nutricional se puede evaluar mediante cuatro enfoques complementarios: la antropometría (estimación de dimensiones y composición corporal), los biomarcadores (de la ingesta de componentes de alimentos y del impacto derivado de la misma), el examen clínico (manifestaciones clínicas derivadas de desequilibrios en la ingesta de nutrientes) y la evaluación dietética (estimación de ingesta de alimentos o de componentes de los alimentos) (Patterson *et al.* 2006). Cada uno de estos enfoques tiene ventajas e inconvenientes respecto a su utilización en individuos o en poblaciones y además, la viabilidad y el coste asociado a la recogida de datos es muy diferente de unos a otros.

En la valoración del estado nutricional se pueden utilizar diversos marcadores, siendo el de elección aquel que cumpliera unos ciertos requisitos, que hicieran su uso útil en cualquier individuo, y que además fuera reproducible y fiable (de Vries *et al.* 2013). Así pues, debería ser consistentemente normal en pacientes con buen estatus nutricional, consistentemente anormal en pacientes con mal estatus nutricional, no verse ser fácilmente afectado por factores no nutricionales y ser fácilmente corregido por un aporte nutricional adecuado (Gil 2010). La realidad es que

no existe ningún marcador que cumpla todos estos requisitos, y por tanto, la elección del más adecuado depende, entre otros, del objetivo que se busca en un trabajo o investigación, del grado de fiabilidad y exactitud que se persigue, y de los medios o recursos disponibles para realizar la medición. Los marcadores nutricionales se clasifican en diferentes grupos: marcadores de exposición, marcadores de estatus y marcadores de función (Figura 12).

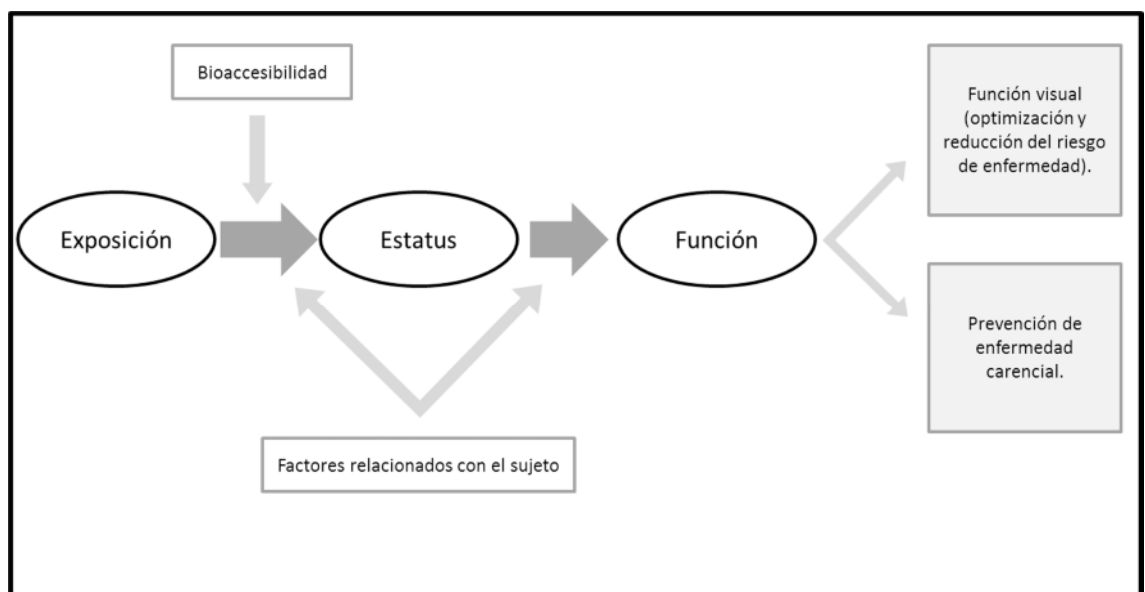


Figura 12. Esquema de la relación entre los marcadores en la evaluación del estado nutricional.

5.1 Marcador de exposición de carotenoides provitamínicos y no provitamínicos: la dieta

En los estudios nutricionales, se valoran como marcadores de exposición la ingesta de alimentos o de componentes de los mismos. Con este fin se utilizan técnicas de evaluación dietética que consisten en conocer los alimentos consumidos, mediante encuestas y posterior

transformación de los datos recogidos en cantidad de alimento consumido, y esta información en ingesta de nutrientes y/o compuestos en estudio, mediante tablas de composición de alimentos (TCA) o bases de datos de composición de alimentos (BDCA) para, finalmente, evaluar los resultados obtenidos mediante la comparación con las recomendaciones de ingesta o con niveles de referencia propuestos en base a determinados objetivos de salud.

5.1.1 Recogida de datos de dieta.

El consumo de alimentos se puede estudiar por una amplia variedad de métodos llamados, de forma general, encuestas dietéticas. La elección del método más adecuado en cada caso es una tarea clave para el éxito de un estudio y se realiza en base al tipo de muestra (individuos, pequeños grupos o población), el diseño, el objetivo del estudio y los recursos disponibles, entre otros. Todas las encuestas dietéticas deben ser validadas previamente en la población en la que se van a utilizar para comprobar si realmente miden lo que se pretende con un grado de exactitud determinado (Moreiras *et al.* 2013). Las encuestas pueden clasificarse en dos grupos según estudien ingesta actual (estudios prospectivos) o pasada (estudios retrospectivos). También pueden clasificarse según su unidad muestral sea una nación (encuestas nacionales), una familia o colectivo pequeño homogéneo como comedores escolares o residencias de ancianos (encuestas familiares y aquellas que se realizan en pequeños colectivos) o un individuo concreto (encuestas individuales) (Carbajal Azcona).

A) Encuestas nacionales

A nivel nacional, para la estimación del consumo de alimentos son muy utilizadas las hojas de balance de alimentos, donde la información se presenta en cantidades per cápita, obtenidas al dividir las cantidades totales anuales de cada alimento por la población del país en el año estudiado (kg/capita/año o g/persona/día), asumiendo un consumo constante a lo largo del año. Los cálculos se realizan basándose en estadísticas nacionales de importación, producción y exportación de alimentos, teniendo en cuenta pérdidas en el almacenamiento o transporte y empleo en usos distintos a la alimentación humana (alimentación animal, semillas para cultivo, usos industriales, producción industrial de alcohol, etc.) (Carbajal Azcona).

B) Encuestas familiares o realizadas en pequeños colectivos homogéneos.

En este tipo de estudios se toma como unidad muestral la familia o un pequeño colectivo homogéneo (como un comedor escolar o una residencia de ancianos). En el primer caso, el tiempo de seguimiento suele ser de una semana, y en el segundo, suele alargarse hasta completar un ciclo completo de menús. Es importante tener en cuenta que, en estos comedores colectivos pueden llevarse a cabo o no, todas las comidas del día (Carbajal Azcona).

La técnica más sencilla consiste en registrar todos los alimentos presentes en la despensa incluida su cantidad, al principio y al final del periodo de estudio, así como todas las entradas, ya sean estas por compra

o regalo, y todas las salidas que no vayan destinadas al consumo por parte del grupo encuestado. La principal desventaja de este método es que considera que todos los miembros tienen unas características de consumo homogéneas, hecho que suele producirse en grupos como comedores escolares o residencias de ancianos, pero no así entre los miembros de una familia (Carbajal Azcona).

Otra técnica que utiliza como unidad muestral la familia es el uso de las Encuestas de Presupuestos Familiares, realizadas por el Instituto Nacional de Estadística periódicamente. Estas encuestas se basan en datos de consumo y gasto intramural. Debido a que la muestra es representativa del país, se puede realizar un análisis nutricional muy completo de la situación de éste con un esfuerzo comparativamente pequeño para la amplia información obtenida. Además permite el análisis de la muestra dividida según diversos criterios demográficos como son (Comunidad Autónoma, nivel de ingresos, nivel de instrucción...). En España hay actualmente disponibles datos de las encuestas realizadas durante los años 1964, 1981 y 1991 (Carbajal Azcona).

C) Encuestas dietéticas para valoración de ingesta individual

Para la valoración de la ingesta individual se utilizan cuestionarios y encuestas preferiblemente llevadas a cabo por un entrevistador entrenado. Éstas se clasifican en dos grupos según registren la encuesta actual (prospectivas) o pasada (retrospectivas). Dentro de las prospectivas clasificamos los registros de consumo de alimentos y dentro de las

retrospectivas los recuerdos de 24 horas, los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos, y las historias dietéticas (Moreiras *et al.* 2013).

Los registros de consumo de alimentos consisten en anotar minuciosamente los alimentos (calidad y cantidad) consumidos a lo largo de los días de encuesta, cuya duración depende principalmente de la heterogeneidad de la dieta y de los nutrientes o sustancias en estudio. Cuando el objetivo es conocer la dieta de un individuo suelen ser suficientes de 3 a 5 días teniendo en cuenta las variaciones, por ejemplo, de fin de semana y, cuando el objetivo es conocer la dieta de un colectivo, se suelen registrar 50 días (por ejemplo 1 día/individuo si hay 50 individuos, o 2 días si hay 25). Las cantidades pueden determinarse por dos técnicas diferentes. La más exacta es la pesada individual precisa y consiste en pesar todos los alimentos que consume el individuo, así como los desperdicios que quedan tras el consumo (Moreiras *et al.* 2013). Para la estimación de los alimentos consumidos se utilizan medidas caseras, raciones frecuentes o atlas fotográficos que representan diferentes raciones de un mismo alimento o plato.

Dentro de los retrospectivos, que estudian la ingesta pasada, como se ha dicho anteriormente, se clasifican el recuerdo de 24 horas, el cuestionario de frecuencia de consumo y la historia dietética. El primero de ellos consiste en recordar y anotar todos los alimentos y bebidas consumidas, así como la forma en que se elaboran los platos, en las últimas 24 horas. Es una de las técnicas más utilizadas por su sencillez y en general, para dietas heterogéneas, se suelen realizar tres recuerdos de 24h a lo largo de un mes (considerando las variaciones entre festivo-laborable). Las

cantidades consumidas suelen estimarse mediante medidas caseras, raciones frecuentes (Moreiras *et al.* 2013) o atlas fotográficos. El cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos consiste en la utilización de un listado de alimentos perfectamente estructurado y organizado según el modelo de consumo del individuo encuestado (número de comidas, número de platos por comida...) sobre la que se solicita que éste responda acerca de la frecuencia diaria, semanal o mensual de consumo de cada uno de ellos referida al último mes, 6 o 12 meses. El cuestionario puede ser cerrado (se incluyen preguntas sobre los alimentos de interés en el estudio en concreto) o abiertos (el sujeto puede incluir los alimentos que consume). Las cantidades consumidas se estiman, como en casos anteriores, mediante medidas caseras, raciones frecuentes o atlas fotográficos de alimentos. Debe ponerse atención en evitar la sobreestimación o subestimación del consumo. El aporte energético total de la dieta es un dato útil en la interpretación de resultados. La elaboración de este cuestionario es específica para cada estudio y depende del tipo de componentes de los alimentos que se deseen valorar como, por ejemplo, los alimentos de origen vegetal en el caso de estudio de carotenoides (Olmedilla-Alonso *et al.* 2015). Por último, la historia dietética que permite conocer la ingesta habitual de una persona, consta de tres partes: un registro de 3 días o, en su defecto, un recuerdo de 24h con el objetivo de conocer el modelo dietético y los hábitos alimentarios, un cuestionario de frecuencia de consumo a partir del que se obtendrá la ingesta de energía y nutrientes, y otra serie de preguntas relacionadas con el objeto de estudio. Éste tipo de encuesta ha de ser realizada por un especialista (Moreiras *et al.* 2013).

Las encuestas individuales, que tienen como unidad muestral el individuo, pueden utilizarse con diversos objetivos. Por un lado, con el objetivo de conocer y evaluar la dieta de un sujeto concreto, y por otro, para conocer y evaluar la dieta de un grupo de mayor o menor tamaño, e incluso de la población de un país, cuando la muestra seleccionada es representativa. De esta forma fue realizada la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española (2009-2010), que es la primera encuesta de consumo directo de alimentos realizada mediante análisis individual en una muestra representativa a nivel nacional (AESAN 2011).

5.1.2 Transformación de los datos de ingesta de alimentos

A partir de los diferentes tipos de encuestas se obtiene un registro de los alimentos y preparaciones consumidos así como de la cantidad, ya sea por pesada o por estimación. Esta estimación se puede llevar a cabo con el uso de tablas de raciones frecuentes, medidas caseras (Moreiras *et al.* 2013) o atlas fotográficos y llevan a la determinación de la cantidad de alimento consumido (g) por día. A continuación, esta información se transforma, en energía, nutrientes, y otras sustancias de estudio (ej. carotenoides), consumidas por día. Para llevar a cabo esta transformación pueden utilizarse BDCA y TCA, con información individualizada de carotenoides (Holden *et al.* 1998, O'Neill *et al.* 2001, Beltrán *et al.* 2012, Moreiras *et al.* 2013). Debido a que en la composición y el contenido de carotenoides en alimentos influyen diversos factores, entre los que se encuentran la localización geográfica y el clima, la estacionalidad, las condiciones de crecimiento, etc. (Maiani *et al.* 2009) es preferible la utilización de TCA que contengan datos de alimentos del país donde se esté

realizando la valoración de la ingesta de carotenoides, siempre que cumplan unos criterios mínimos de calidad (Olmedilla-Alonso *et al.* 2015). En España, por ejemplo, la Base de Datos Española de Composición de Alimentos, coordinada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), no incluye datos individualizados de contenido de carotenoides, por lo que para obtener este tipo de información hay que utilizar los datos publicados en artículos científicos con contenido en hortalizas y frutas españolas (ej. Granado *et al.*, 1992, Olmedilla *et al.*, 1993) (Granado *et al.* 1992, Olmedilla *et al.* 1993). A nivel internacional también son escasas las TCA de carotenoides en alimentos (West *et al.* 1993, Holden *et al.* 1998, O'Neill *et al.* 2001).

Criterios para la adecuada selección de las tablas y bases de datos de composición de carotenoides en alimentos

Es importante utilizar tablas de contenido individualizado de carotenoides en alimentos porque facilitan el cálculo de la actividad vitamínica del alimento expresada en ER y EAR o en otras formas de expresión que puedan plantearse en base al conocimiento sobre su biodisponibilidad y conversión en formas activas y, por otro lado, para aumentar el conocimiento relativo a la ingesta y fuentes dietéticas de determinados carotenoides que, en base a diversos tipos de estudios, muestran actividades biológicas de interés en la salud humana (ej. luteína y zeaxantina en función visual, licopeno en relación con sistema cardiovascular) (Olmedilla-Alonso *et al.* 2015). Tradicionalmente, las TCA y las BDCA han incluido únicamente datos de los carotenoides con actividad provitamínica A, expresando su contenido total o su aporte al contenido de

vitamina A en el alimento (Moreiras *et al.* 2013). Estos datos, en la mayoría de las TCA elaboradas en España son bibliográficos (Mataix *et al.* 2003, AESAN 2006, CESNID 2009, Martínez Burgos *et al.* 2009, Moreiras *et al.* 2013), y pocas incluyen datos analíticos (Requejo *et al.* 2004).

En general, las fuentes de la variabilidad observada en los datos publicados de contenido de carotenoides en alimentos incluyen aspectos relacionados con la representatividad de la muestra de alimento analizada, la identificación del alimento y el método analítico. Estos factores determinan el grado de confianza con el que el usuario de las TCA puede manejar los datos. La representatividad de la muestra de alimento analizada es importante teniendo en cuenta que el porcentaje de variabilidad en el contenido de forma natural es considerable por los factores mencionados en el apartado anterior. En la identificación del alimento se incluyen los siguientes aspectos: nombre local y nombre científico, descripción del alimento, parte de la planta consumida y porcentaje de porción comestible, análisis del alimento en forma cruda o cocida o procesada, grado de maduración, estacionalidad y humedad de la muestra. Por último, dentro del proceso analítico, es fundamental que la técnica de análisis utilizada permita una separación y cuantificación correcta de los carotenoides presentes en la muestra del alimento, como es el caso de análisis por HPLC (Olmedilla-Alonso *et al.* 2015); también es importante conocer si la muestra del alimento ha sido sometido a saponificación. La importancia del proceso de saponificación se debe a que las xantofilas de numerosos alimentos se encuentran esterificadas y en esta forma química no suelen ser detectadas y cuantificadas. Por ello, al ser sometidas a saponificación, con la consiguiente rotura del éster, se permite

la detección y cuantificación de la xantofila libre, además de suponer un paso crítico cuando el alimento contiene sustancias que pueden interferir en el análisis (ej. clorofilas) (Zheng *et al.* 2015).

Es fundamental escoger cuidadosamente las fuentes de información sobre el contenido en carotenoides de los alimentos ya que un error en este aspecto podría dar lugar a que el contenido de carotenoides de la dieta en estudio fuera sobre o infraestimado, en mayor o menor medida dependiendo de la frecuencia de consumo de determinados alimentos (Granado *et al.* 1997a, Faber *et al.* 2013).

5.1.3 Comparación con las ingestas de referencia

Como se ha indicado en el apartado 2 de esta introducción, únicamente existen recomendaciones de ingesta de carotenoides en función de su actividad provitamínica (IOM 2001). En nuestro país, las más ampliamente utilizadas son las de Moreiras *et al* (Moreiras *et al.* 2013), las publicadas por la FESNAD en base al acuerdo entre numerosas sociedades españolas (FESNAD 2010) y las tablas internacionales publicadas por el IOM (IOM 2001) (Tabla 3).

5.2 Marcadores de estatus de carotenoides

En el ámbito de los estudios nutricionales, en general, se define como marcador a una características que puede ser objetivamente medida y valorada como un indicador de la ingesta dietética, de hábitos de vida, de procesos biológicos o /y patológicos. Como marcador biológico (biomarcador) se considera a la característica que es objetivamente medida y valorada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o como respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (de Vries *et al.* 2013).

Debido a que existe una amplia evidencia epidemiológica que asocia elevadas concentraciones de carotenoides en suero obtenidos dietéticamente, con un menor el riesgo de sufrir diversas enfermedades crónicas (Johnson *et al.* 2010) estas concentraciones han sido utilizadas como marcadores de estatus en numerosos estudios (Al-Delaimy *et al.* 2005, Olmedilla-Alonso *et al.* 2014, Burrows *et al.* 2015). La concentración sérica de carotenoides es el mejor método disponible para valorar el estado nutricional de estos compuestos, aunque es importante tener en cuenta que las concentraciones normales de carotenoides en sangre son muy variables debido a que dependen de numerosos factores tanto fisiológicos, como debidos al alimento o al estilo de vida (IOM 2000).

En relación con la ingesta dietética, está ampliamente extendido el hecho de que las concentraciones de carotenoides en conjunto, en suero, reflejan el consumo de frutas y hortalizas, hasta el punto de que pueden ser consideradas biomarcadores de su ingesta (IOM 2000, Al-Delaimy *et al.* 2005, Maiani *et al.* 2009, Baldrick *et al.* 2011, Burrows *et al.* 2015). No ocurre lo mismo con las concentraciones de los carotenoides

independientes debido a la diversidad en la composición de estos alimentos (Burrows *et al.* 2015). Sí pueden utilizarse, sin embargo, como marcadores de su propia ingesta ya que, aunque son muy variables, como se deduce de la mayoría de estudios realizados hasta el momento, las correlaciones entre ellos son en muchos casos significativas (ej. α - y β -caroteno) (Burrows *et al.* 2015), oscilando entre valores de 0,2 y de 0,7. Siendo, los carotenoides que más frecuentemente muestran correlaciones significativas, los carotenoides provitamínicos (Burrows *et al.* 2015).

5.2.1 Carotenoides provitamínicos

En un estudio publicado en 2001, realizado en 5 países europeos tomando como muestra 80 individuos sanos entre 25-45 años, que ofrece las concentraciones séricas de carotenoides provitamínicos y no provitamínicos en cada uno de ellos, los datos de concentración de β -criptoxantina de España fueron los que presentaron valores más altos (0,40 y 0,42 $\mu\text{g/dl}$, en hombres y mujeres), mientras que los de Irlanda del Norte son los que los presentaron más bajos (0,14 $\mu\text{g/dl}$ en hombres y 0,19 $\mu\text{g/dl}$ en mujeres). Sin embargo en cuanto a la concentración de carotenos, nuestro país se sitúa en el rango inferior de concentraciones con 0,07 $\mu\text{g/dl}$ para ambos sexos para α -caroteno y 0,38 y 0,36 $\mu\text{g/dl}$ para hombres y mujeres respectivamente, para β -caroteno. Francia marca el rango superior de concentraciones para ambos, con concentraciones de 0,12 y 0,17 $\mu\text{g/dl}$ para α - y 0,54-0,84 $\mu\text{g/dl}$ para β -caroteno (Olmedilla *et al.* 2001).

Los carotenoides en suero no suelen ser tenidos en cuenta en la valoración del estatus de vitamina A. Respecto a los valores de referencia

del retinol en suero superiores a 300 µg/l (1,05 µmol/l), indican un estatus adecuado asociado a ausencia de signos clínicos de deficiencia, mientras que inferiores a 200 µg/l (0,7 µmol/l) son considerados reflejo de un estatus inadecuado de vitamina A. Los bajos niveles de retinol en suero/plasma pueden ser originados por factores diferentes a una ingesta inadecuada de retinol (ej. Ingesta inadecuada de proteínas, energía, zinc, estados de inflamación o infección que afectan a la síntesis de la *retinol binding protein*). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los niveles séricos de retinol no reflejan la ingesta de vitamina A cuando se encuentran dentro del rango de normalidad (30-80 µg/dl) ya que el retinol en sangre está controlado homeostáticamente y sólo es un buen indicador cuando las reservas hepáticas están por debajo del rango mínimo aceptable o cuando hay un exceso (<20 µg y >300 µg retinol /g hígado) (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015).

5.2.2 Luteína y zeaxantina

5.2.2.1 Concentraciones en suero

La determinación de las concentraciones en suero de luteína y zeaxantina ha sido considerado el mejor método disponible para establecer su estatus nutricional en humanos (Cardinault *et al.* 2003, Carpentier 2009, Lien *et al.* 2011a) aunque están afectadas por factores dietéticos y por otros relacionados con el individuo, que influyen en su absorción y utilización (Cardinault *et al.* 2003, Granado *et al.* 2003, Thurnham 2007b, Carpentier 2009, Lien *et al.* 2011a, Shardell *et al.* 2011). En el estudio en sujetos control en cinco países europeos anteriormente mencionado (Olmedilla *et al.* 2001), los mayores niveles de luteína en suero estaban en

el grupo de Francia (18 $\mu\text{g/dl}$ y 23 $\mu\text{g/dl}$, en hombres y mujeres respectivamente), seguido de España (15 y 16 $\mu\text{g/dl}$, en hombres y mujeres, respectivamente), situándose en tercer lugar Holanda (10 y 13 $\mu\text{g/dl}$ en hombres y mujeres, respectivamente) y ocupando los últimos lugares se encuentran la República de Irlanda: 8,5 y 9,7 $\mu\text{g/dl}$ en hombres y mujeres respectivamente e Irlanda del Norte con unas concentraciones sanguíneas de 8 y 9 $\mu\text{g/dl}$ en hombres y mujeres respectivamente. En cuanto a la zeaxantina, las mayores concentraciones fueron las del grupo español (6,2 y 4 $\mu\text{g/dl}$, hombres y mujeres respectivamente), seguido de Francia (5 y 4,5 $\mu\text{g/dl}$), siguiendo el resto de países el mismo orden que en el caso de la luteína: Holanda (2,8 y 3,4 $\mu\text{g/dl}$), República de Irlanda (2,3 y 2,8 $\mu\text{g/dl}$) e Irlanda del Norte (2 y 3 $\mu\text{g/dl}$). En diversos estudios en sujetos españoles (adultos) se muestran concentraciones de luteína entre 8 y 15 $\mu\text{g/dl}$ y el centil 95 es 25 $\mu\text{g/dl}$ (Olmedilla *et al.* 1992, Olmedilla *et al.* 1997, Granado *et al.* 1998).

En población norteamericana la concentración media de luteína + zeaxantina en el estudio NHANES (2003-2004, edades entre 1y 93 años) fue de 20 $\mu\text{g/dl}$ (centiles 5 y 95: 8 – 42 $\mu\text{g/dl}$)(CDC 2008). Los valores conjuntos de luteína y zeaxantina en suero en población americana son similares a los descritos en sujetos españoles adultos (mencionados anteriormente), alrededor de 20 $\mu\text{g/dl}$.

En base a la amplia información disponible sobre contenido en alimentos y en suero, estudios epidemiológicos e *in vitro*, estudios de intervención en humanos (con diversos objetivos), se puede considerar que es deseable mantener una concentración de luteína en suero en el rango entre 0,6 y 1,05 $\mu\text{mol/l}$ (34 – 60 μg luteína /dl) (Granado *et al.* 2003) para

procurar un efecto beneficioso sobre la función visual y asegurar una adecuada disponibilidad en tejidos (ej. en mácula), ya que estos niveles se han asociado con efectos beneficiosos, sin riesgo de posibles efectos secundarios (Shao *et al.* 2006).

5.2.2.2 Densidad de pigmento macular

En el ojo, la mácula lútea está localizada en la zona central de la retina. En ella se encuentran acumuladas selectivamente luteína, zeaxantina y su isómero mesozeaxantina (este último no es de origen dietético), en unas concentraciones mucho mayores que en suero/plasma y el resto del organismo. Estos carotenoides constituyen el pigmento macular, cuya densidad puede considerarse un marcador de estatus a largo plazo de luteína y zeaxantina, ya que los efectos de la ingesta tardan en manifestarse, igual que en revertir tras una disminución en su aporte (Zeimer *et al.* 2009). El pigmento macular se puede medir de forma objetiva en muestras tisulares mediante HPLC (Bone *et al.* 1985, Handelman *et al.* 1988), pero no es factible en la práctica clínica y por ello se han desarrollado otros métodos no invasivos en base al espectro de absorción que presentan los carotenoides de la mácula. Actualmente, el método más utilizado se basa en la fotometría heterocromática de parpadeo (método psicofísico), que desde hace algunos años está disponible en el mercado en equipos de fácil manejo y con buena fiabilidad (van der Veen *et al.* 2009). Estos métodos determinan la densidad óptica de pigmento macular cuyos valores se sitúan entre el 0 y el 1 siendo, de acuerdo a la bibliografía, 0,3 un valor medio, < 0,2 un nivel bajo y > 0,5 un alto valor de densidad óptica de pigmento macular (DOPM) (Bernstein *et al.* 2010). Existen numerosos

factores intrínsecos del individuo (ej. edad, sexo), además de los extrínsecos (tabaco, dieta,...) que afectan a estos valores. En principio las personas con mayor edad suelen presentar menores valores que los más jóvenes. También es importante considerar el efecto del sexo ya que, en general, las mujeres tienen valores de densidad de pigmento macular inferiores. Una posible explicación a este hecho es que las mujeres poseen una mayor proporción de tejido adiposo que los hombres, y el tejido adiposo secuestra los carotenoides por su carácter lipofílico, lo que impide que parte de la luteína y zeaxantina del torrente sanguíneo lleguen a la retina y se acumulen en ella. El color del iris de los ojos también parece influir en la densidad óptica de pigmento macular, siendo los ojos más oscuros los que mayores valores presentan. Esto puede suceder, bien porque los carotenoides y la melanina compartan el mecanismo que los deposita, o bien porque las retinas de los ojos altamente pigmentados, es decir, oscuros, se exponen a mucha menos luz que los claros (Murray 2014).

5.3 Marcadores de efecto sobre la función visual

Las intervenciones nutricionales pueden tener diferentes objetivos: eliminar / prevenir una deficiencia nutricional (ej. ceguera por deficiencia de vitamina A) u optimizar una determinada función (ej. la función visual). En el caso de las enfermedades carenciales ligadas a ausencia de nutrientes, se dispone de marcadores clínicos que permiten valorar el resultado de la intervención. Así, la vitamina A, administrada tanto en forma de retinol como de carotenoides con actividad provitamina A (IOM 2001, WHO/FAO 2004, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015) posibilitan la resolución de la enfermedad y, aparte de los síntomas clínicos,

se dispone de diversas pruebas que informan del curso de esta (el test de ceguera nocturna o la citología de impresión de la conjuntiva) (IOM 2001, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015). Se han desarrollado numerosos test para determinar la ceguera nocturna; entre los test objetivos destacan la adaptación a la oscuridad, el test de respuesta pupilar y el test del umbral de visión nocturna (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015). La citología de impresión de la conjuntiva, (impresión en papel de filtro de la superficie de la córnea, con posterior tinción, conteo y evaluación de células), tiene como finalidad evaluar el grado de queratinización y xeroftalmia; es una técnica que fue muy utilizada en los años 90, pero que no ha sido adoptada a nivel general (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015).

En las últimas décadas, puesto que en el mundo occidental casi han sido eliminadas las enfermedades por deficiencias de micronutrientes (OMS 1990), las intervenciones nutricionales buscan obtener una salud óptima, potenciando alguna función del organismo, como puede ser la visual, o disminuyendo el riesgo de una enfermedad crónica (ej. DMAE). Así, un aumento en la ingesta de luteína y zeaxantina se asocia con una optimización en la función visual (Richer *et al.* 2004, Lien *et al.* 2011b, Puell *et al.* 2013). La agudeza visual podría definirse de una forma general como la medida que describe y cuantifica el grado en el que el sistema visual puede realizar los requerimientos presentados por las tareas visuales (Shcereumder 2014). De entre los procedimientos para valorar la agudeza visual, la sensibilidad al contraste parece ser el más adecuado (Loskutova *et al.* 2013). La sensibilidad al contraste (SC) es la capacidad que tiene el sistema visual para discriminar un objeto del fondo en el que se encuentra

situado. De una forma más técnica se define como la capacidad de detectar contrastes de luminancia. En términos de psicofísica es la inversa del contraste mínimo perceptible o umbral de contraste. La medición de la sensibilidad al contraste del ojo es un estudio de la visión más completo que la medida standard de agudeza visual ya que proporciona, por un lado, información de la detección de objetos de diferentes frecuencias espaciales (diferentes tamaños) y por otro lado, de variable contraste, obteniendo así la función de contraste visual (Shcereumder 2014). Para la medición de la SC se utilizan diferentes test que pueden clasificarse principalmente en dos grupos: los que utilizan pantallas electrónicas, y los que utilizan láminas impresas más o menos traslúcidas. En los últimos años, se ha visto más extendido el uso de los primeros, porque su evolución hacia dispositivos totalmente computarizados, permite el control de numerosas variables como la luminancia del fondo, tamaño del estímulo, frecuencia con la que se presentan los estímulos, entre otros (Santillan *et al.* 2014).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta memoria es el estudio de los carotenoides relacionados con la salud ocular con un enfoque dietético /nutricional, considerando aquellos que constituyen el pigmento macular (luteína y zeaxantina), cuya actividad está relacionada con una mejor función visual y un menor riesgo de diversas enfermedades oculares asociadas al envejecimiento y también, los que son precursores de retinol (β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina) y contribuyen a su aporte al ciclo visual. En los estudios se han utilizado marcadores de ingesta dietética, de estatus nutricional (concentraciones séricas de luteína y zeaxantina y densidad óptica de pigmento macular) y de función (sensibilidad al contraste). También, se ha determinado la bioaccesibilidad de carotenoides con actividad provitamínica A por ser un aspecto clave en la relación ingesta y estatus.

Para la consecución del objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Elaboración de una base de datos (BD) de carotenoides de alimentos consumidos en España a partir de datos analíticos generados mediante HPLC, y desarrollo de una aplicación informática, que incluya dicha BD, para el cálculo de la ingesta individualizada de carotenoides y su contribución a la ingesta de vitamina A.
2. Cálculo de la ingesta individualizada de carotenoides, su contribución a la ingesta de vitamina A e identificación las principales fuentes dietéticas en la población española en

base a la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (2009-2010).

3. Evaluación de la bioaccesibilidad de carotenoides con actividad provitamínica A a partir de las frutas con elevado contenido de β -criptoxantina.
4. Estudio de los marcadores dietéticos (ingesta de luteína y zeaxantina, ingesta de frutas y hortalizas) y de estatus de luteína y zeaxantina (concentración en suero y densidad de pigmento macular) en sujetos control, valorando la influencia de la edad, el sexo y lípidos séricos. Correlaciones entre marcadores y valoración de su valor predictivo sobre la densidad de pigmento macular.
5. Valoración la relación entre los distintos marcadores de ingesta y estatus de luteína y zeaxantina sobre la función visual (sensibilidad al contraste, con y sin deslumbramiento) y el valor predictivo de la densidad de pigmento macular,

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describen los materiales y métodos en tres apartados. Los dos primeros están dedicados a los estudios en alimentos y en humanos, y el tercero al análisis estadístico

1. Determinación de carotenoides en alimentos

Durante el desarrollo de esta tesis se han llevado a cabo análisis de carotenoides en alimentos como parte de dos estudios diferentes y con dos metodologías diferentes. Los primeros análisis se desarrollaron con el fin de completar la Base datos de carotenoides (Beltrán *et al.* 2012), y más recientemente se realizaron estudios de bioaccesibilidad de carotenoides en aquellos alimentos que son principal fuente de β -criptoxantina de la dieta española y que además contienen β -caroteno.

1.1 Extracción de carotenoides de alimentos

Para estos análisis se escogieron alimentos que suponen una buena fuente de carotenoides pero no habían sido analizados previamente por el grupo (Granado *et al.* 1992, Olmedilla *et al.* 1993, Olmedilla *et al.* 1998), o que no han sido tradicionalmente consumidos en España pero cuyo consumo va en aumento en los últimos años: baya de Gogi, calabaza, canónigo, kiwi amarillo, maíz fresco desgranado, mango, piña y rúcula. La extracción de carotenoides fue la publicada por Granado *et al.*, 1992 (Olmedilla *et al.* 1992), con ligeras modificaciones: se tritura el alimento fresco en una batidora comercial de uso doméstico (PICADORA MOULINEX LUXE, TIPE 649) hasta obtener un homogeneizado, se pesa por triplicado

entre 5 y 30 g de homogeneizado (dependiendo del color) y se añade, sobre cada muestra 50 ml de metanol:tetrahidrofurano (THF) (1:1) y MgCO_3 (10% del peso de la muestra). Se agita durante 15 minutos en agitador magnético y se filtra en placa filtrante (poro 4) al vacío. Se repite la extracción hasta que el extracto orgánico tras la filtración sea incoloro. Posteriormente se transfiere a 50 ml de hexano:diclorometano (5:1) en ampolla de decantación eliminando la acetona con agua. Se repite la partición hasta que el extracto acuoso sea incoloro. Se transfiere a rotavapor donde se lleva a sequedad, se reconstituye en 25 ml de solvente de inyección, etanol:THF (2:1) y se filtra con filtro de 0,45 μm antes de inyectar un volumen de 5 μl en el HPLC.

Con el fin de determinar la presencia de ésteres de carotenoides y de limpiar el extracto, de sustancias interferentes, como clorofilas y lípidos indeseables, a la extracción de carotenoides le siguió una saponificación alcalina del extracto. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado en alícuotas de entre 300 y 500 μl de extracto (Granado *et al.* 2001). Sobre la muestra se añade el mismo volumen de etanol (grado HPLC) con ácido pirogálico al 0,1 M y de KOH al 40% en metanol (grado HPLC). Tras agitar en ultrasonido durante 7 minutos se lava con el doble de volumen de agua destilada y se extrae con el cuádruple de volumen de hexano:diclorometano (5:1) agitando en vortex y centrifugando a 3 500 rpm 3 minutos. Por último se deseca el sobrenadante en atmósfera de nitrógeno, se reconstituye en el mismo volumen de solvente de inyección del que se partió (etanol:THF, 2:1) y se filtra con un filtro de 0,45 μm antes de ser inyectado en el HPLC (5 μl).

Recientemente, en el estudio de bioaccesibilidad de frutas se optó por realizar un procedimiento de extracción diferente (Rosso *et al.* 2007). La extracción se realiza a partir de 10-25 g de homogenizado de la muestra según su color. Se tritura con celite en mortero y se extrae con acetona filtrando al vacío con filtro de poro 4, repitiendo la acción hasta que el extracto sea incoloro. Posteriormente se transfiere a dietil-éter:éter de petróleo (1:1) en ampolla de decantación eliminando la acetona con agua destilada. Se repite la extracción hasta que el extracto acuoso sea incoloro. Se eliminan los posibles restos de agua con sulfato sódico anhidro y se transfiere a rotavapor donde se lleva a sequedad. Se reconstituye en solvente de inyección (metanol:metil terbutil eter (MTBE) , 70:30) y se filtra con filtro 0,45 µm antes de ser inyectado en el HPLC (10 µl).

A continuación del proceso de extracción también en este estudio se llevó a cabo una saponificación alcalina mediante un procedimiento muy semejante al descrito anteriormente con tres diferencias: el solvente de extracción en este caso es dietil éter:éter de petróleo, ambos grado HPLC en proporción 1:1, el de reconstitución final es metanol:MTBE, en proporción 70:30 y una pequeña variación en los volúmenes de trabajo (se inicia con 800 µl y se utiliza el mismo volumen de las soluciones de ácido pirogálico y de KOH, 1 500 µl de agua en el lavado, 3 000 µl de solvente de extracción, y 320 µl de solvente de inyección).

1.1.1 Análisis de carotenoides mediante HPLC

El equipo de HPLC consta de una bomba modelo 600, inyector manual Rheodyne 2998, detector de fotodiodo array (PDA) (Waters, Milford, MA, USA). Para el análisis de alimentos de la base de datos y de

suero del estudio en humanos se utilizó una columna cromatográfica C18 Spheri-5 ODS 5 μm (220 mm \times 4.6 mm) (Brownlee Labs, Applied Biosystem, Santa Clara, CA, USA) con una precolumna (Aquapore ODS type RP-18). El método instrumental consistía en un gradiente con fase A compuesta por acetonitrilo y metanol (grado HPLC) en una proporción 85:15, que cambiaba hacia la fase B compuesta por acetonitrilo, diclorometano y metanol (grado HPLC) en una proporción 70:20:10 en gradiente lineal desde el minuto 5 al 20. Ambas fases se estabilizan con acetato amónico (0,025 mol/l) añadido al metanol. El flujo fue de 1,8 ml y la detección se realizó a 450 nm. Todos los cromatogramas fueron procesados por el programa Empower 2 software (Waters, Milford, MA, USA).

Para el análisis de los análisis de alimentos implicados en el estudio de bioaccesibilidad (sin digerir y digeridos), se utilizó el mismo equipo de cromatografía, pero con una columna YMC C30 (5 μm 250 \times 4,6 mm). El uso de diferentes columnas implica un cambio de fases y, por tanto, de gradiente. En este caso la fase A es metanol con trietil amina (TEA) al 0,1% para estabilizar los tiempos de retención, y la fase B es MTBE el flujo utilizado es de 0,9 ml/min. Con esta columna se han utilizado dos métodos en función de si la muestra contiene o no licopeno. El método utilizado para alimentos que no contienen licopeno es el siguiente: las proporciones de fase A:fase B son las siguientes: a tiempo 0, 95:5, cambia hacia 70:30 en 30 minutos y permanece en esa proporción durante 20 minutos, para, a continuación volver a la proporción 95:5 en 5 minutos. El método para análisis de los seis carotenoides mayoritarios, incluyendo el licopeno, comienza con la misma proporción de solventes 95:5 (fase A:fase B), y también varía hasta 70:30 en 30 minutos, a continuación cambia a 50:50 en

20 minutos y permanece en esa proporción 30 minutos, hasta el minuto 80, y por último vuelve a 95:5 en 3 minutos.

1.1.2 Curvas de calibrado en las columnas C18 y C30.

La identificación de picos se realizó por tiempo de retención así como por espectro de absorbancia en comparación con estándares. Éstos fueron comprados a Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Se disolvieron en tetrahidrofrano para su almacenamiento a -80 °C. Antes de la preparación de las curvas de calibrado se determinó su concentración en el espectrofotómetro a una longitud de onda específica para cada carotenoide. (Tabla 4) cambiándolo de solvente y aplicando dos diluciones diferentes, a partir de estas soluciones se elaboraron diferentes curvas de calibrado en función de las necesidades de cada proyecto.

CAROTENOIDE	DILUCIONES	SOLVENTE	LONGITUD DE ONDA (nm)	E ^{1%} _{1cm}
LUTEÍNA	1:20 y 1:10	Etanol	445	2550
ZEAXANTINA	1:20 y 1:10	Etanol	450	2540
β-CRIPTOXANTINA	1:20 y 1:10	Eter de petróleo	452	2386
LICOPENO	1:20 y 1:10	Eter de petróleo	472	3450
α-CAROTENO	1:20 y 1:10	Eter de petróleo	444	2800
β-CAROTENO	1:20 y 1:10	Eter de petróleo	453	2592

Tabla 4. Datos de E 1%_{1cm} y longitud de onda tomados de De Ritter *et al.*

(De Ritter *et al.* 1981)

Para el análisis del contenido en carotenoides en alimentos realizado con la columna C18 se prepararon curvas con 4-5 puntos y las siguientes características:

CAROTENOIDE	CANTIDADES INYECTADAS (ng)	R ²
LUTEÍNA	1,58 / 3,67 / 5,26 / 10,27 / 15,80	0,986
ZEAXANTINA	2,89 / 5,79 / 8,68 / 14,47	0,999
β-CRIPTOXANTINA	3,81 / 7,61 / 11,42 / 19,03	0,999
LICOPENO	0,21 / 0,42 / 0,63 / 1,05	0,992
α-CAROTENO	2,04 / 4,08 / 6,11 / 10,19	0,998
β-CAROTENO	4,15 / 8,29 / 12,44 / 20,70	0,996

Tabla 5. Características de las curvas patrón para análisis de alimentos con columna C18.

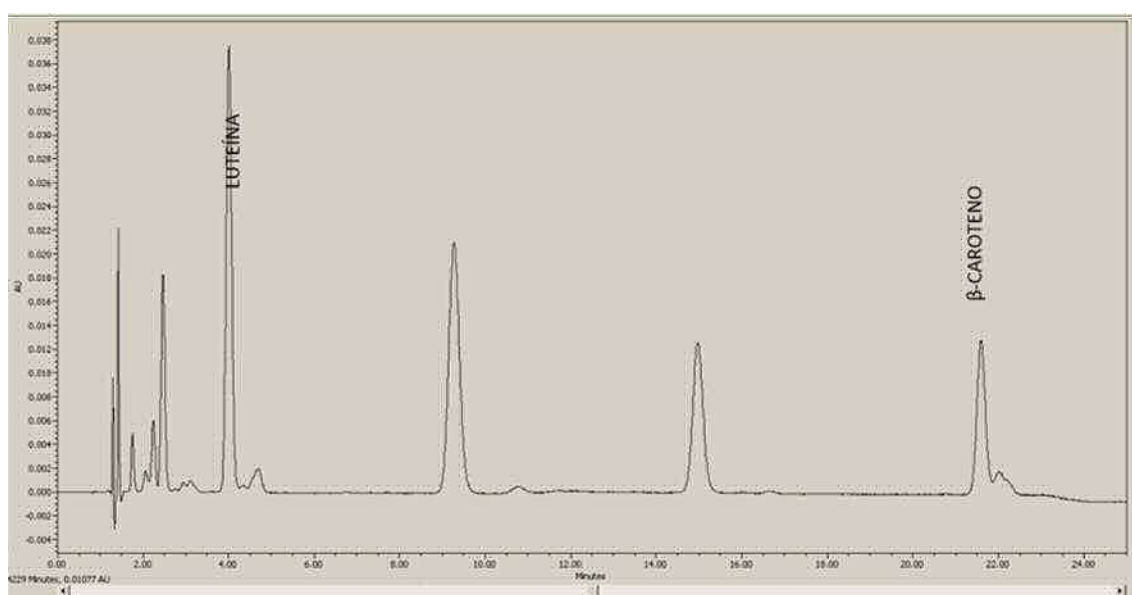


Figura 13. Cromatograma de un extracto de canónigo obtenido con la columna C18.

Para el análisis de alimentos del estudio de bioaccesibilidad se utilizaron dos curvas diferentes para cada carotenoide debido a las grandes diferencias de contenido entre los diferentes alimentos, así como entre cada alimento y el extracto de su muestra digerida. Debido a el objetivo del proyecto eran los carotenoides con actividad provitamina A, solamente se prepararon curvas de: β -caroteno, α -caroteno, y β -criptoxantina. Las curvas de concentraciones altas tenían 4 puntos y las siguientes características:

CAROTENOIDE	CANTIDADES INYECTADAS	R ²
β -CRIPTOXANTINA	120,0 / 80,0 / 25,0 / 10,0	0,992
α -CAROTENO	120,0 / 80,0 / 25,0 / 10,0	0,992
β -CAROTENO	120,0 / 80,0 / 25,0 / 10,0	0,991

Tabla 6. Características de las curvas patrón (concentraciones altas) para análisis de alimentos con columna C30.

Y las de concentraciones bajas tenían también 4 puntos y las siguientes características:

CAROTENOIDE	CANTIDADES INYECTADAS (ng)	R ²
β -CRIPTOXANTINA	10,0 / 6,0 / 2,0 / 0,5	0,995
α -CAROTENO	10,0 / 6,0 / 2,0 / 0,5	0,995
β -CAROTENO	10,0 / 6,0 / 2,0 / 0,5	0,997

Tabla 7. Características de las curvas patrón (concentraciones bajas) para análisis de alimentos con columna C30.

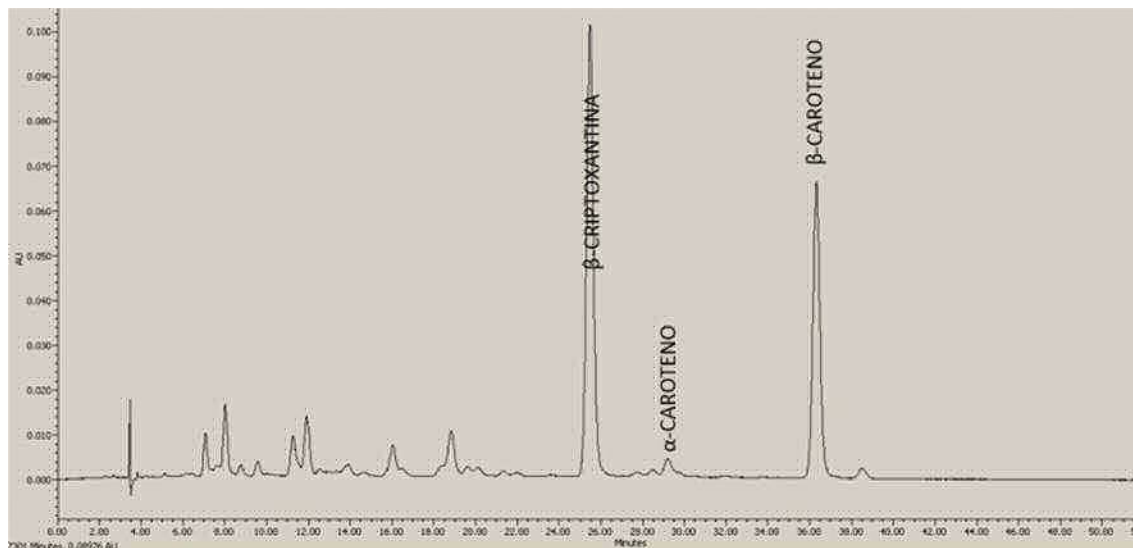


Figura 14 Cromatograma de un extracto de níspero con la columna C30.

1.2 Método de digestión *in vitro* para determinación de la bioaccesibilidad de carotenoides a partir de frutas.

La bioaccesibilidad de una sustancia se define como la cantidad, o proporción de ésta que está disponible para ser absorbida tras un proceso digestivo. Por ello para determinar la bioaccesibilidad de los carotenoides es necesario conocer, tanto el contenido inicial (cuyo protocolo se explica en el apartado 1.1), como la cantidad disponible para la absorción tras el proceso de digestión *in vitro*.

El protocolo seguido para realizar los ensayos de digestión *in vitro* está basado en la propuesta de método consenso para análisis de bioaccesibilidad a partir de alimentos recientemente publicada (Minekus *et*

al. 2014a), realizando ligeras modificaciones para adaptarlo al estudio de la bioaccesibilidad de carotenoides.

El protocolo consta de tres fases: oral, gástrica e intestinal, seguidas de una centrifugación para separar el sobrenadante en la fracción digerida. Para cada fase se utiliza un fluido simulador formado por diferentes concentraciones de sales minerales en el que van disueltas las enzimas correspondientes: Fluido simulador de saliva (SSF), fluido simulador gástrico (SGF) y fluido simulador intestinal (SIF) los cuales se almacenaron congelados a -20 °C descongelándose cada día la fracción necesaria. Las soluciones enzimáticas se almacenaron a 4 °C durante el tiempo que duraron los análisis, que fue inferior a dos semanas.

El procedimiento se describe a continuación: Se pesan 5 gramos de muestra homogeneizada (mismo homogeneizado del que se toma la muestra para la extracción de carotenoides del alimento). En la primera fase, la fase oral, se añaden, sobre la muestra, los siguientes compuestos a 37°C 3,5 ml de SSF, 0,5 ml de α -amylasa con una concentración de 1 500 U/ml, 25 μ L de una solución de CaCl_2 con una concentración de 0,3 M, y por último se añade agua destilada para alcanzar un volumen final de 10 ml y se agita a 37 °C durante 2 minutos en un baño. Al finalizar esta primera fase, se sacan las muestras del baño y se colocan en baño de hielo mientras se añaden los siguientes reactivos a 37 °C: 7,5 ml de SGF, 1,6 ml de solución de pepsina con una concentración de 25 000 U/ml, 5 μ L de la solución de CaCl_2 0,3 M, se ajusta el pH a $3 \pm 0,2$ con HCl 6M y se lleva a un volumen final de 20 ml con agua destilada. Se vuelve a introducir en el baño con agitación a 37 °C durante dos horas. No se realiza un ajuste de pH a lo largo de las fases (ni gástrica ni duodenal) ya que el laboratorio no dispone de

dispositivo tinnitus y en ensayos previos se comprobó que las variaciones eran pequeñas y que durante el tiempo en el que se lleva a cabo dicho ajuste las condiciones de temperatura y agitación propias de la fase se ven modificadas. Al finalizar el periodo de incubación de dos horas comienza la fase duodenal. Las muestras vuelven a sacarse del baño y colocarse en hielo durante la adición de los siguientes reactivos: 10 ml SIF (En el protocolo inicial se añaden 11 ml, pero al introducir en el protocolo específico de carotenoides la colesterol esterasa que va disuelta en 1ml de esta misma fase, solamente se añaden 10 ml de SIF), 1 ml de una solución de colesterol esterasa de concentración 3,077 U/ml, 5 ml de solución de pancreatina con una concentración de 800 U/ml de actividad tripsina, 2,5 ml de solución de bilis con una concentración de 160 mM de sales biliares y 40 µl de la solución de CaCl_2 0,3 M. Por último se ajusta el pH a $7 \pm 0,2$ con NaOH 1 M y se añade agua destilada hasta un volumen final de 40 ml. Se vuelve a introducir en el baño con agitación a 37 °C durante otras 2 horas. Al finalizar las dos horas, se retira el frasco del baño y se enfría (hasta alcanzar unos 10-15 °C) en baño de hielo o en agua. Por último se centrifuga a 10 000 g durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante y se congela para posterior extracción (dentro de un periodo máximo de una semana).

1.2.1 Extracción de carotenoides a partir de alimentos digeridos

La extracción de los carotenoides de la solución resultado de la fase duodenal de la digestión se realiza por duplicado con 20 ml de éter dietílico agitando en placa agitadora durante 1 minuto asegurando el vortex. Para la separación de las fases acuosa y etérea se utilizan 10 ml de NaCl 10% y centrifugación a 4 °C a 10 000 g 10 minutos. A continuación, y tras asegurar

la total eliminación del agua mediante adición de sulfato de sodio anhidro, el extracto se lleva a sequedad en rotavapor y se reconstituye en solvente de inyección (Metanol:MTBE, 70:30) y se filtra con un filtro de 0,45 μ m antes de ser inyectado en el HPLC (10 μ l).

1.2.2 Valoración de la actividad enzimática de los enzimas implicados en la digestión *in vitro*.

Las concentraciones de las soluciones enzimáticas utilizadas vienen expresadas en el protocolo estándar en unidades de actividad, en el cual se indican también los procedimientos para determinar su actividad enzimática. Estas metodologías se describen brevemente a continuación:

Ensayo enzimático α -amilasa

Este ensayo se basa en la siguiente definición de unidad de actividad enzimática: una unidad de α -amilasa libera 1,0 mg de maltosa A partir del almidón en 3 minutos a pH 6,9 a 20 °C. El procedimiento se describe brevemente a continuación: Una solución de almidón al 1% en tampón fosfato se enfrenta durante 3 minutos, en las condiciones descritas anteriormente, a tres concentraciones diferentes de α -amilasa (entre 0,33 y 0,50 μ g/ml en el tubo de reacción) obteniéndose como producto tres concentraciones diferentes de maltosa. La maltosa reacciona con tartrato de sodio y potasio y ácido 3-5 dinitrosalicílico (reactivo de color). Esta mezcla se transforma en una solución coloreada tras permanecer 15 minutos a temperatura de ebullición. Se mide su color por espectrofotometría a 540 nm y se cuantifica frente a una curva patrón de maltosa con concentraciones entre 0,001% y 0,033%.

Ensayo enzimático de pepsina

La unidad de actividad enzimática se define a continuación: una unidad de pepsina produce un aumento en la absorbancia de 0,001/min a $\lambda=280$ nm a pH 2 y 37 °C, medida como productos solubles en ácido tricloroacético (ATCA). El protocolo se resume a continuación: se añaden diferentes cantidades de pepsina sobre la solución sustrato (hemoglobina al 2%). El protocolo sugiere el uso de concentraciones por ejemplo entre 0,8 µg/ml y 5 µg/ml, pero con el fin de garantizar la linealidad en la medición de la absorbancia, se añadió la cantidad de enzima necesaria para alcanzar concentraciones entre 3,3 y 7,5 µg/ml en la cubeta de reacción. La mezcla se incubó exactamente durante 10 minutos a 37 °C. La pepsina actúa sobre la hemoglobina liberando aminoácidos aromáticos solubles en ATCA (tirosina). A continuación, se añade una solución al 5% de ATCA a cada muestra con el fin de detener la reacción. La hemoglobina se precipita por centrifugación a 6 000 g durante 30 minutos a 4 °C y se mide la absorbancia del sobrenadante. Se calcula el aumento en la absorbancia de la muestra frente al blanco.

Ensayo enzimático de pancreatina (actividad de la tripsina)

De acuerdo con el protocolo (Minekus *et al.* 2014b), la cantidad de pancreatina añadida a la muestra de la digestión *in vitro* debe ser determinada en base a la actividad de la tripsina. Aunque también indica que se debe medir la actividad amilasa y lipasa de la pancreatina, estas determinaciones no se realizaron por razones económicas. El ensayo de actividad enzimática de la tripsina se basa en la siguiente definición de

unidad de actividad: 1 unidad de tripsina hidroliza 1 μmol de p-tolueno-sulfonil-L-arginina metil éster (TAME) por minuto a 25 °C, pH 8,1. Esta hidrólisis libera p-tolueno-sulfonil-L-arginina, que absorbe la luz en $\lambda=247$ nm en las condiciones descritas. Para determinar los μmol de TAME hidrolizados por minuto, se mide la absorbancia cada 30 segundos durante 10 minutos. Este ensayo se realizó con una concentración de enzima en la en la cubeta de reacción entre 0,3 y 0,6 $\mu\text{g/ml}$.

Ensayo enzimático de colesterol esterasa

Puesto que el uso de colesterol esterasa no se menciona en el protocolo de consenso (Minekus *et al.* 2014b), pero para el estudio de carotenoides es de interés su incorporación en el protocolo de trabajo (Granado-Lorencio *et al.* 2007b)(Granado-Lorencio *et al.*, 2007) con el fin de medir su actividad enzimática, se optó por un ensayo enzimático ampliamente utilizado (Sigma Aldrich) y para simplificar el análisis y reducir su coste, se utilizó un kit de uso clínico para la determinación de la concentración de colesterol libre en sangre, que se basa en los mismos fundamentos y utiliza los mismos reactivos, varios de los cuales se encuentran incluidos en una única solución. El fundamento es el siguiente: 1 unidad de colesterol esterasa causa la formación de 1 μmol de peróxido de hidrógeno por minuto (0,5 μmol de quinoneimina) bajo las condiciones descritas a continuación. Cuando un éster de colesterol entra en contacto con la colesterol esterasa, se produce una liberación de colesterol libre, cuya concentración se mide con el kit de la siguiente manera: el colesterol libre se oxida por la acción de la colesterol oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno, que reacciona con 4-aminoantipirina y fenol para producir

colorante quinoneimina y produciendo un aumento de la absorbancia, que se mide por espectrofotometría a 500 nm a 37 °C cada 30 segundos. Todos estos reactivos están contenidos en una solución suministrada con el kit (reactivo R).

La preparación de las soluciones se realiza de la siguiente forma: El éster de colesterol (en este caso, linoleato de colesterol) se disuelve en isopropanol, y a continuación se diluye con una solución de Triton X100 caliente al 1% para obtener una concentración del éster de 0,39 mg/ml. Sobre esta solución, una vez enfriada, se añade colato de sodio. La colesterol esterasa se disuelve en 2% de BSA y se prepara una dilución 1:10 en tampón fosfato a pH 7 para obtener una concentración de 0,085 mg/ml.

Se añade a la cubeta espectrofotométrica solución sustrato (para alcanzar una concentración en la cubeta de 0,052 mg/ml), seguido de la adición de reactivo R y de solución tampón con el fin de diluir la mezcla. Se espera el tiempo necesario para que el colesterol previamente libre en la solución de éster, reaccione con el reactivo R, después de lo cual se añaden 0,1 ml de enzima (ó 0,1 ml de búfer en el blanco), y se realizan mediciones cada 30 segundos. La actividad enzimática se calcula en base a la pendiente de la porción lineal inicial de la curva de absorbancia.

Ensayo para determinar la concentración de sales biliares en el extracto biliar

Para medir la concentración de sales biliares en el extracto biliar, se utilizó un ensayo basado en la siguiente reacción: en presencia de NAD, la 3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa oxida los ácidos biliares, formando tio-NADH, cuya concentración es determinada por el aumento de

absorbancia a 405 nm de la solución. Para este ensayo, se empleó un kit para uso clínico que proporciona todos los reactivos necesarios para la medición en muestras de suero. Por esta razón, como el disolvente para el extracto de bilis, se utilizó una mezcla de sueros en el que se determinó previamente la concentración de sales biliares. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit explicadas brevemente a continuación: se mide el aumento de absorbancia a 405 nm a 37 °C entre los 60 y 120 segundos tras mezclar los reactivos (el reactivo R y el extracto de bilis en suero con concentraciones en la cubeta de reacción de entre 0,05 y 0,26 mg/ml). La concentración se obtuvo mediante la comparación de dicho aumento con la de un calibrador de concentración conocida sometido al mismo procedimiento.

2. Marcadores de estatus de carotenoides en humanos

En el desarrollo de esta tesis se incluyen dos estudios en humanos, uno transversal analítico, otro de valoración nutricional de la población española. El primer estudio se enmarcó dentro del proyecto Biomarcadores de luteína y zeaxantina en la relación dieta y salud ocular humana: evaluación de concentraciones en suero y dieta, densidad de pigmento macular y función visual (Instituto de Salud Carlos III; PS09/00681), (Documentación del proyecto Anexos 1-3) cuyo objetivo fue valorar los biomarcadores de estatus nutricional de luteína y zeaxantina en personas con edades comprendidas entre 20 y 35 años y entre 45 y 65 años, así como la función visual. Para ello se seleccionaron sujetos con las siguientes

características: 108 voluntarios (54 hombres, 54 mujeres) con edades en dichos rangos, con un índice de masa corporal inferior a 31 kg/m², que no tomaran medicación ni productos específicamente diseñados para disminuir el colesterol en sangre, que no tuvieran cataratas y que no consumieran complementos vitamínicos, minerales o de luteína. El diseño del estudio fue el siguiente:

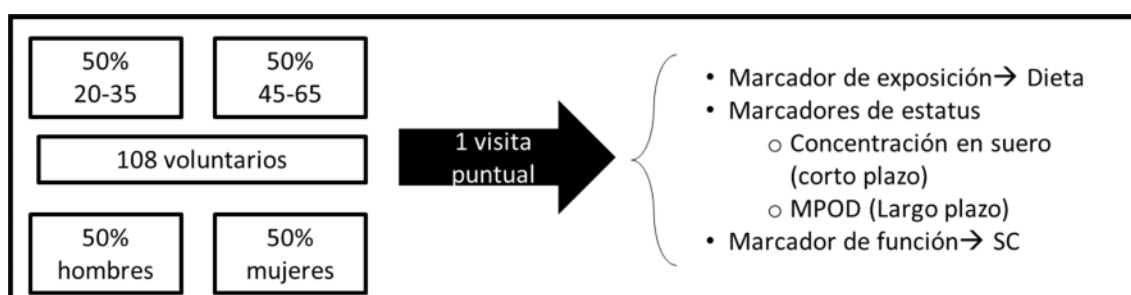


Figura 15. Esquema de estudio Biomarcadores de luteína y zeaxantina

El segundo estudio tuvo como objetivo la valoración de la ingesta de carotenoides y vitamina A de la población española en base a los datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE), la cual forma parte de un estudio de evaluación nutricional de la ingesta de la población adulta española llevado a cabo por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad a través de la AESAN. La muestra incluyó 3 000 individuos no institucionalizados de edades comprendidas entre 18 y 64 años y fue seleccionada para ser representativa de la población Española (AESAN 2011). El objetivo del estudio fue conocer la ingesta de vitamina A, tanto a partir de retinol como de carotenoides provitamínicos así como de carotenoides sin dicha actividad. Se utilizaron datos de contenido en carotenoides en alimentos analizados por HPLC (Beltrán *et al.* 2012).



Figura 16. Esquema del estudio basado en ENIDE.

2.1 Marcador de exposición: Dieta

En ambos estudios se realizó una evaluación de la ingesta dietética. La metodología consiste en cuatro etapas principales: adquisición de datos, transformación de los datos de dieta en ingesta diaria de alimentos, transformación de esta información en ingesta diaria de energía, nutrientes y carotenoides, y por último, evaluación frente a recomendaciones de ingesta.

En el estudio a nivel nacional, las dos primeras etapas fueron llevadas a cabo por la AESAN. La recogida de datos se llevó a cabo mediante un recuerdo de 24 horas y un registro de consumo de 3 días. Ésta institución publicó los datos de ingesta de alimentos por día en el informe de la ENIDE (AESAN 2011), datos en base a los cuales se partió para obtener el consumo medio diario de nutrientes y carotenoides en la población y evaluarlos frente a ingestas de referencia nacionales e internacionales. Para la adquisición de datos del otro estudio se utilizaron 3 recuerdos de 24 horas realizados en un periodo de 7 a 10 días por parte de un entrevistador especializado. El primero se realizó de manera presencial y los otros dos telefónicamente. Esta información se completó con un pequeño cuestionario de frecuencia de consumo de los alimentos que suponen una

mayor contribución a la ingesta de carotenoides: frutas, hortalizas (teniendo en cuenta procesamiento), huevos, pescados (por la relación de los ácidos grasos con la DMAE) y legumbres. **(Anexo 4)**

Los datos de ingestas registrados como platos o recetas fueron transformados en gramos ingeridos de alimento por día mediante el uso de tablas de raciones frecuentes y medidas caseras ampliamente utilizadas en España (Moreiras *et al.* 2013). A continuación se realizó la transformación de estos datos de ingesta de alimentos por un lado en ingesta diaria de energía y nutrientes, y por otro en ingesta diaria de carotenoides. Para el cálculo de energía y nutrientes se utilizaron dos fuentes diferentes, para el estudio de transversal analítico unas tablas de composición de alimentos ampliamente utilizadas en España (Moreiras *et al.* 2013), y para el estudio a nivel nacional, un software composición de alimentos para la determinación de retinol y de energía (ALCE Ingeniería 2012). Para la determinación de la ingesta diaria de carotenoides de los sujetos, se utilizó para los dos estudios, una aplicación informática desarrollada por nuestro grupo (Estévez-Santiago *et al.* 2013).

Por último, para evaluar la adecuación de la ingesta, ésta se enfrentó a recomendaciones de ingesta emitidas por diversos organismos de salud pública de cada país. Las recomendaciones de ingesta de componentes esenciales presentes en la dieta se emiten en base al conocimiento científico disponible en cada momento, que relacione la ingesta de los nutrientes con el estado de salud. Hay recomendaciones de ingesta para los carotenoides en cuanto a su capacidad de contribuir a la ingesta de vitamina

A, pero no en relación con otros posibles beneficios para la salud. En España las recomendaciones más utilizadas son las publicadas por Moreiras *et al.* (Moreiras *et al.* 2013) (1000 y 800 µg ER/día para hombres y mujeres, respectivamente) y las emitidas por el Institute of Medicine (EEUU) (IOM 2001) (900 µg y 700 µg Equivalentes de Actividad de Retinol (EAR)/día , para hombres y mujeres, respectivamente), siendo también de interés la comparación con las emitidas por la FESNAD (FESNAD 2010) (700 y 600 µg Equivalentes de Retinol (ER) /día para hombres y mujeres, respectivamente), ya que esta entidad agrupada a todas las sociedades españolas.

2.1.1 Compilación de base de datos de carotenoides

Los carotenoides incluidos en la Base de Datos de composición en carotenoides son aquellos más ampliamente estudiados en el contexto dieta y salud humana, tres de ellos poseen actividad provitamínica A (β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina) y otros tres no (luteína, zeaxantina y licopeno). La contribución de estos carotenoides a la ingesta de vitamina A, se ha expresado como ER (WHO/FAO 2004, Moreiras *et al.* 2013) y como EAR (IOM 2001).

$$\text{ER } (\mu\text{g/día}) = \text{retinol} + (\beta\text{-caroteno}/6) + (\alpha\text{-caroteno}/12) + (\beta\text{-criptoxantina}/12).$$
$$\text{EAR } (\mu\text{g/día}) = \text{retinol} + (\beta\text{-caroteno}/12) + (\alpha\text{-caroteno}/24) + (\beta\text{-criptoxantina}/24).$$

Los datos incluidos son datos analíticos obtenidos mediante HPLC, la mayoría de ellos son propios, ya publicados (Granado *et al.* 1992, Olmedilla *et al.* 1993, Olmedilla *et al.* 1998) y son completados con otros generados

para esta base de datos siguiendo el mismo procedimiento analítico (valorado como “altamente aceptable”) (West *et al.* 1993). Se completa la información con datos bibliográficos europeos (O'Neill *et al.* 2001) y de EEUU (Holden *et al.* 1998, Holden *et al.* 1999) que muestran el contenido de luteína y zeaxantina de forma conjunta.

Los alimentos incluidos son aquellos que constituyen los aportes principales a la ingesta de carotenoides en España y en Europa (Granado *et al.* 2007a, Maiani *et al.* 2009): frutas y hortalizas, mayoritariamente, y también productos lácteos, así como el aceite de oliva y los huevos porque su consumo cuantitativo en la población española (AESAN 2011) podría influir en la ingesta total de carotenoides. Se incluyen datos de los alimentos en forma cruda, tras proceso de cocción o procesados industrialmente.

2.1.2 Desarrollo de aplicación informática para el cálculo de ingesta dietética de carotenoides

La aplicación informática para el análisis de ingesta dietética de carotenoides se desarrolló en Java 7 (v.7). La base de datos de composición de carotenoides a partir de la cual realiza los cálculos es la publicada previamente por nuestro grupo (Beltrán *et al.* 2012) y cuya metodología está explicada en el apartado anterior. Esta aplicación permite ser editada añadiendo nueva información de análisis de carotenoides en alimentos.

Los datos incluidos son los de aquellos carotenoides que se estudian más frecuentemente en su relación con la salud, pero se ofrece la

posibilidad de incluir valores para otros catorce carotenoides: γ -caroteno, α -criptoxantina, fitoeno, fitoflueno, violaxantina, neoxantina, neurosporeno, capsantina, capsorubina, anteraxantina, lactucaxantina, cantaxantina, astaxantina y equinenona, por las posibles implicaciones en salud que puedan surgir con estudios futuros, así como por su interés en agronomía, etc.

Los alimentos incluidos son casi exclusivamente de origen vegetal, y son los mayores contribuyentes a la ingesta de carotenoides de la dieta europea (Granado *et al.* 1996, O'Neill *et al.* 2001, Granado *et al.* 2007b) pero la aplicación permite añadir más alimentos con su correspondiente contenido. Su descripción incluye los siguientes datos: nombre común, nombre científico, color de la porción comestible (rojo-anaranjado, blanco-amarillento y verde), origen (vegetal o animal), grupo de alimentos al que pertenece según las TCA de Moreiras *et al.* (Moreiras *et al.* 2013), porción comestible (PC), referencia bibliográfica y, por último, contenido en carotenoides y vitamina A (RE (Moreiras *et al.* 2013) y RAE (IOM 2001)).

Las variables incluidas en la aplicación sobre los sujetos en estudio son: sexo, edad, peso y talla. Respecto a las dietas de cada sujeto, se incluye si fue recogida en día laboral o festivo, si la ingesta de cada alimento se realizó en el desayuno, media mañana, comida, merienda, cena o fuera de estas cinco comidas, y, el alimento ingerido y la cantidad.

La base de datos a partir de la cual se desarrolló la aplicación, no incluye información sobre la PC de los alimentos incluidos, por lo que, este dato fue tomado de los artículos originales publicados por nuestro grupo, y para aquellos alimentos cuyos datos habían sido compilados se utilizaron

las PC indicadas en las TCA de Moreiras *et al.* (Moreiras *et al.* 2013) Por último, se consideró que la PC de los alimentos cocinados, era 100 g/100 g, ya que la porción no comestible se elimina antes del procesamiento.

La aplicación informática emite tres tipos de informes: uno con la ingesta de carotenoides media por tipo de comida (desayuno, comida...), por cada día de encuesta y la media de todos los días, otro con la ingesta de carotenoides a partir de alimentos clasificados por colores, y el último, con la ingesta a partir de cada grupo de alimentos.

2.2 Marcadores de estatus

2.2.1 Concentración de carotenoides en suero

La determinación de carotenoides en suero se realizó por HPLC, los métodos instrumentales utilizados para este dispositivo han sido ya descritos. La extracción de las muestras de sangre de los sujetos de estudio se realiza tras ocho horas de ayunas con el uso de tubos sin anticoagulante. A continuación éstos son centrifugados a 3 500 rpm durante 10 minutos con el objetivo separar el suero. Se almacena el sobrenadante en crioviales a una temperatura de -80 °C hasta su análisis. La extracción de carotenoides se realiza de la siguiente forma: se toman 600 µl de suero sobre el que se añade el mismo volumen de etanol grado HPLC y se vortea la mezcla durante 1 minuto. A continuación se añaden 1 200 µl una mezcla de hexano:diclorometano (5:1) y se vortea 2 min. Se separan las fases por centrifugación a 3 500 rpm durante 3 minutos y se recoge el sobrenadante en otro tubo. Se repite la extracción y se evaporan los dos sobrenadantes conjuntamente en atmósfera de nitrógeno. Se reconstituye en 300 µl de

solvente de inyección (etanol:THF, en proporción 2:1) para posterior inyección en HPLC con *loop* de 5µl, obteniéndose un cromatograma semejante al de la figura 17 con el uso de la columna C18.

La identificación, cuantificación y preparación de las curvas patrón se llevaron a cabo por el mismo método descrito anteriormente. Para estos análisis las curvas patrón, tenían 4 puntos, y las siguientes características:

CAROTENOIDE	CANTIDADES INYECTADAS (ng)	R ²
LUTEÍNA	0,38 / 0,76 / 1,13 / 1,89	0,997
ZEAXANTINA	0,13 / 0,25 / 0,38 / 0,63	0,994
β-CRIPTOXANTINA	0,81 / 1,61 / 2,42 / 4,04	0,999
LICOPENO	0,61 / 1,22 / 1,82 / 3,04	0,997
α-CAROTENO	0,24 / 0,47 / 0,71 / 1,18	0,994
β-CAROTENO	1,21 / 2,43 / 3,64 / 6,07	0,996

Tabla 8. Características de las curvas patrón para análisis de suero con columna C18.

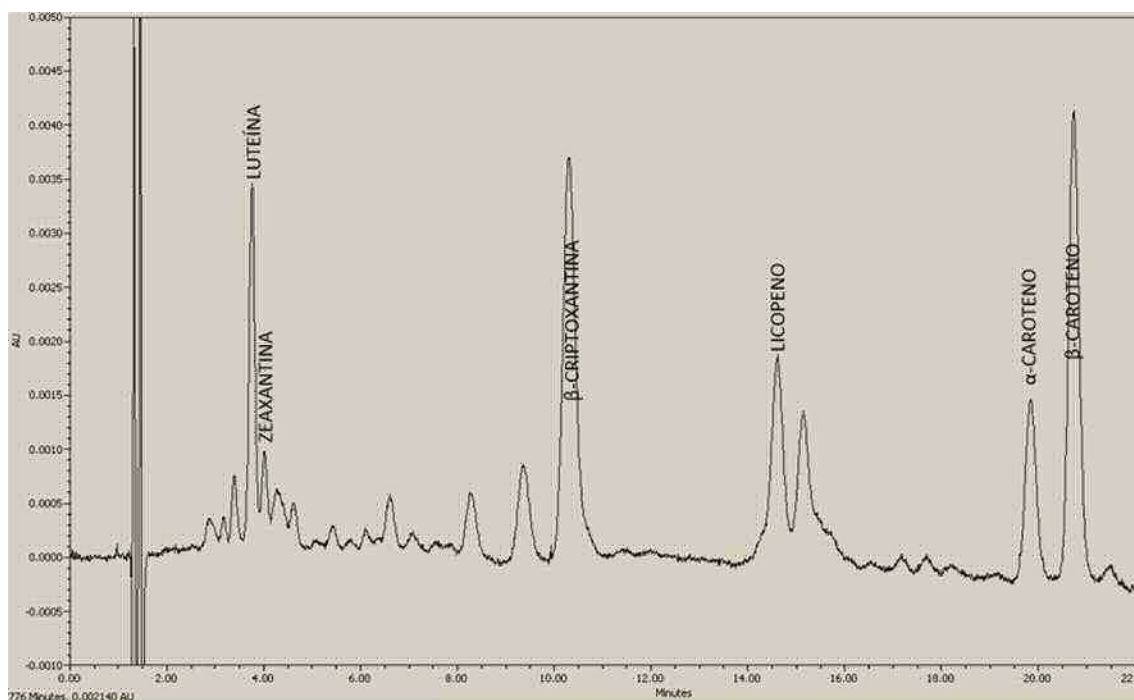


Figura 17. Cromatograma de un extracto de carotenoides a partir de suero con columna C18.

2.2.2 Determinación de la densidad del pigmento macular

La mácula es la zona central de la retina, está relacionada con la visión central y está constituida por el pigmento macular, el cual está compuesto por tres carotenoides: luteína, zeaxantina (de origen dietético) y meso-zeaxantina, obtenida por transformación de la luteína. La densidad óptica del pigmento macular (DOPM) está relacionada con el riesgo de degeneración macular y es, a su vez, dependiente de la ingesta de luteína y zeaxantina y, por tanto, marcador de su estatus nutricional (Olmedilla-Alonso *et al.* 2014).

La DOPM ha sido medida durante años mediante técnicas de fotometría heterocromática de parpadeo (Murray 2014). Esta técnica consiste, brevemente, en que el observador ajusta el ratio de luminancia

entre dos fuentes superpuestas de luz, que se alternan con una frecuencia de 15 Hz, de forma que desaparezca o al menos se minimice el parpadeo. Dichas fuentes tienen longitudes de onda diferentes: una que es absorbida por el pigmento macular, de color azul (465 nm) y otra que no es absorbida, de color verde (530 nm). En esta técnica el sujeto percibe parpadeo durante casi todo el tiempo, y por ajuste de la intensidad de las dos fuentes de luz busca el cese de éste. Estos ajustes se realizan tanto en un punto central como una zona periférica de la retina.

El dispositivo utilizado para este estudio (Figura 18) MPS 9000 desktop device (Macular Pigment Screener, Elektron PLC, Cambridge, UK) se basa en la misma técnica aunque incluye varias diferencias respecto a los métodos utilizados hasta ahora. La primera es que la prueba se realiza con diferentes ratios fijos de luminancia entre las dos fuentes de luz (verde/azul) y que éstos son fijados por el software, no por el sujeto. En estos ratios, la suma de luminancias se mantiene constante, para ello se compensan las luminancias verde y azul de tal modo que si de un ratio al siguiente, la luminancia de la fuente verde aumenta, la de la fuente azul compensará disminuyendo. La siguiente diferencia consiste en que varía dentro de cada ratio de luz verde/azul es la frecuencia con la que se alternan las fuentes de luz, comenzando para cada ratio a una frecuencia de 60 Hz y disminuyendo a una velocidad de 6 Hz/segundo, que es la velocidad de descenso determinada como óptima en un estudio piloto. El objetivo es determinar el punto en el que la frecuencia disminuye lo suficientemente como para que el ojo del sujeto sea capaz de detectar la alternancia de las fuentes como un parpadeo de la luz, al contrario del método antiguo en el que se buscaba la desaparición de dicho parpadeo

mediante el ajuste de las luminancias a una frecuencia fija (van der Veen *et al.* 2009) .



Figura 18. Imagen del dispositivo de medición de la DOPM.

El procedimiento práctico con cada sujeto es el siguiente: Se realizan dos pruebas, una para la zona central de la retina y otra para la zona periférica siguiendo ambos protocolos muy semejantes. En la prueba central el sujeto fija la vista en un círculo de 1 grado de diámetro situado a 0 grados del centro. En él se superponen las dos fuentes de luz azul anteriormente descritas (a 465 nm y a 530 nm) que en este caso son leds, y situadas sobre una luz blanca que constituye el pedestal, cuyo objetivo es controlar el contraste de luminancias. El área de alrededor del círculo tiene una luminancia determinada, semejante a la del objetivo con el fin de minimizar las posibles variaciones en el tamaño de pupila del sujeto debidas a la edad. En un primer momento el software realiza un test para asegurar que el sujeto realiza la prueba en la zona media de su rango de detección de parpadeo, y a continuación comienza la prueba. La prueba se realiza con diferentes ratios de luminancia verde/azul que en los primeros ratios implica una mayor intensidad del verde y posteriormente se va invirtiendo aumentando la intensidad del azul. Para cada ratio el objetivo va alternando

un led y otro. Al principio esta alternancia se produce a una frecuencia alta (60 Hz) de forma que el sujeto solo percibe una luz fija, no detecta parpadeo, a medida que avanza la prueba la frecuencia va disminuyendo hasta que traspasa el umbral de percepción del sujeto, y éste detecta el parpadeo. Entonces el sujeto presiona un botón y esa frecuencia queda registrada. Al repetirse la prueba para diferentes ratios verde/azul se registra la frecuencia a partir de la que el parpadeo es detectable para cada uno de ellos obteniéndose una gráfica con forma de “V” como la que se muestra a continuación (**Figura 19**). La prueba se repite para la zona periférica de la retina de la siguiente forma: el sujeto fija la vista en un círculo excéntrico situado a 8 grados con un radio superior, de 1,75 grados, y tiene que percibir el parpadeo del círculo central. Esto se realiza, como en el test central, a los distintos ratios de luminancia, y se obtiene también una gráfica en forma de “V”. De ambas gráficas, el punto de interés es el mínimo de la curva, ya que es el punto de isoluminancia e indica el ratio de luminancia verde/azul en el que el sujeto precisa una mayor disminución de la frecuencia para percibir el parpadeo. La razón para realizar ambas mediciones es la siguiente: el pigmento macular absorbe parte de la luz azul emitida por el led y solamente se localiza en la zona central de la retina y no existe en la zona en la que se realiza la prueba periférica. Sin embargo tanto en la zona central como en la periférica, el cristalino también es responsable de parte de la absorción de la luz, y en mayor grado a medida que aumenta la edad del sujeto. De esta forma, al calcular la absorción de luz azul en la zona central en la que existen pigmento macular y cristalino, y en la periférica en la que solamente hay cristalino, el software puede realizar el cálculo de la absorción debida al pigmento macular y, como consecuencia, de la densidad óptica de pigmento macular.

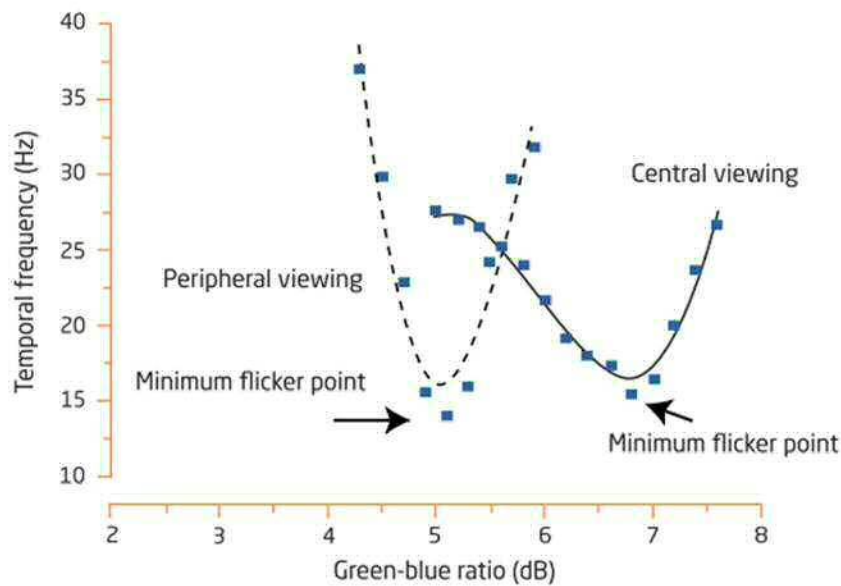


Figura 19. Gráfica obtenidas tras la realización de la prueba con el dispositivo MPS 9000. Resultados de la prueba periférica (línea con guiones) y la central (línea continua) (Murray *et al.* 2013).

2.3 Marcador de función visual: la sensibilidad al contraste (SC).

La sensibilidad al contraste se define como la capacidad que tiene el sistema visual para discriminar un objeto del fondo en el que se encuentra situado y de una forma más técnica, se define como la capacidad de detectar contrastes de luminancia. En términos de psicofísica es la inversa del contraste mínimo perceptible o umbral de contraste. La agudeza visual puede medirse por diversos métodos como la tabla de Snellen y el método de SC. La medición de la SC del ojo es un estudio de la visión más completo que la medida standard de agudeza visual, ya que proporciona información de la detección de objetos de diferentes frecuencias espaciales (diferentes

tamaños) y de variable contraste, obteniendo así la función de contraste visual (Shcereuder 2014).

En el estudio incluidos en esta tesis, la sensibilidad al contraste fue medida con el dispositivo Contrast Glaretester CGT-1000 (Takagi, Japan) (Figura 20) que determina el umbral de contraste, por medio de una estrategia automatizada, para 6 tamaños de estímulos anulares lo que suponen diferentes frecuencias espaciales, es decir, diferentes diámetros (desde 6,3 hasta 0,7 grados de ángulo visual). El umbral de contraste se presenta en 12 niveles, dese 0,01 hasta 0,45, siendo la sensibilidad al contraste la inversa del umbral.



Figura 20. Dispositivo Contrast Glaretester CGT-1000.

La luminancia del fondo sobre el que se presenta el estímulo es de 10 cd/m^2 . El tiempo de examen en cada ojo es muy rápido, aproximadamente 2 minutos, lo que evita la fatiga del paciente. Las características que se seleccionaron para la presentación del estímulo fueron: tiempo de presentación: 0,2 segundos, intervalo de presentación: 2 segundos, luminancia del test con deslumbramiento: 40 000 cd/m^2 , distancia de

examen: 350 mm. El dispositivo cuenta con 8 fuentes deslumbrantes situadas alrededor del estímulo que se activan automáticamente para valorar, además, la sensibilidad al contraste con deslumbramiento simultáneo en una segunda parte de la prueba. Los resultados del examen se imprimen automáticamente en una sola gráfica para cada ojo que presenta las funciones de sensibilidad al contraste sin y con deslumbramiento. En la figura 21 pueden observarse, punteados, los rangos de normalidad para diferentes edades: menores de 40 años (A), comprendidas entre 40 y 60 años (B) y mayores de 60 años (C).

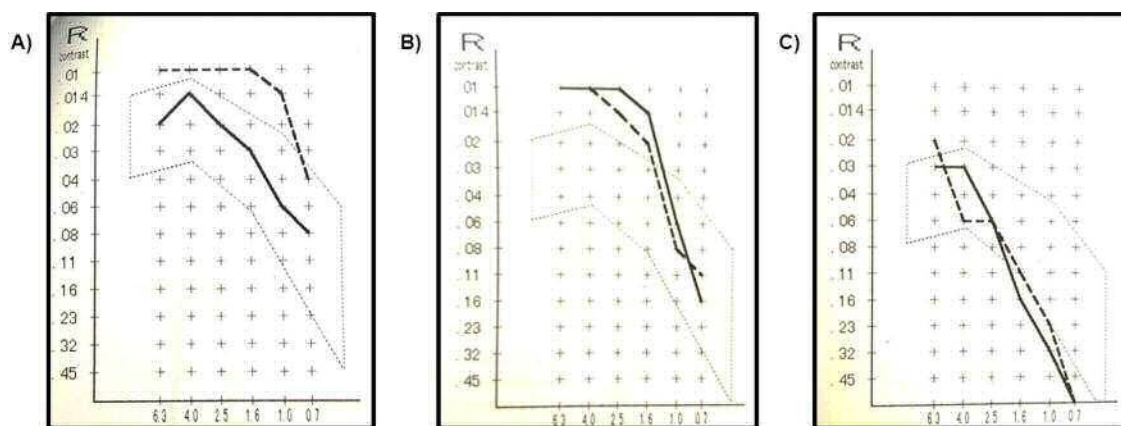


Figura 21. Gráfica obtenida tras la prueba de sensibilidad al contraste.

El test se realiza para ambos ojos por separado. El procedimiento de la prueba se describe a continuación: Sobre un fondo blanco aparecen, de una en una, anillas de distintos tamaños (entre 0,7 y 6,3 grados de ángulo visual) y con diferentes niveles de contraste (12 niveles de contraste entre 0,01 y 0,45) y cada vez que el sujeto detecta una de ellas debe presionar un pulsador. Se determina cuál es el contraste mínimo que el sujeto es capaz de distinguir para cada tamaño de anilla, definiéndose éste como umbral de contraste. Se repite la prueba con las fuentes deslumbrantes encendidas

para determinar los umbrales de contraste con deslumbramiento. La SC para cada ángulo se define como la inversa de dichos umbrales.

3. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media y la desviación estándar, la mediana y el intervalo de confianza del 95%. La distribución de los datos se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El valor p de significación se calculó en base a la prueba t, de dos lados, a un nivel de significación del 5%. El paquete estadístico utilizado en todos los análisis fue el SPSS (v.20, v.21 y v.23) (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

En el **estudio de los marcadores de estatus de luteína y zeaxantina**, dado que las variables en dieta y algunos parámetros bioquímicos en suero (ej. triglicéridos) no muestran una distribución normal, se utilizaron métodos no paramétricos para comparar las variables analizadas (U de Mann–Whitney, Wilcoxon). Se valoró la influencia de los factores sexo y edad. Las correlaciones se analizaron también por métodos no paramétricos (coeficiente de correlación Spearman).

Mediante un análisis por regresión lineal generalizado introduciendo como covariables sexo y edad se observó que sólo la edad influye en la variable dependiente (DOPM). El análisis de regresión lineal se usó mediante el procedimiento de eliminación (“hacia atrás”) con DOPM como la variable dependiente y las siguientes variables como dependientes: sexo,

edad, luteína y zeaxantina y luteína+zeaxantina en dieta y suero, luteína+zeaxantina/ colesterol+triglicéridos, luteína+zeaxantina/ HDL-colesterol, luteína+zeaxantina/ LDL-colesterol así como la ingesta de frutas y hortalizas (gramos).

El tamaño muestral del estudio de marcadores de estatus de luteína y zeaxantina se calculó en base a un valor medio de DOPM de 0.40 du (DS=0,10) para obtener un 10% de diferencia en el DOPM (SD=0.04du) con un 85% de poder y un error alfa de 0.05. El número de sujetos necesario fue 108.

En el **estudio sobre dieta y DOPM**, para detectar posibles diferencias entre los grupos en las variables: edad y sexo, los valores medios se compararon mediante pruebas paramétricas y no paramétricas (Student t-test y prueba de Mann Whitney-U), dado que era difícil de confirmar la distribución normal en algunas de las variables analizadas. De esta manera, se pudo confirmar que las diferencias observadas no fueron consecuencia de la distribución de las variables. Por la misma razón, para detectar posibles diferencias entre la ingesta de luteína y la zeaxantina a partir de los grupos de alimentos, se realizaron una prueba paramétrica (prueba t pareada) y un test no paramétrico (Wilcoxon).

Se analizaron las posibles diferencias en la variable dependiente: DOPM, teniendo en cuenta los factores de edad y sexo. El análisis mediante modelo lineal general reveló que la edad tenía un efecto significativo sobre el DOPM, y que había una interacción entre la edad y el sexo en el grupo de mayor edad.

El análisis de las relaciones entre las variables de dieta y suero se llevó a cabo usando una matriz de correlación de Pearson. El análisis de las relaciones entre la variable principal: DOPM, y las variables de ingesta se realizó en forma conjunta por medio de análisis factorial y modelo lineal general (incluido el sexo, la edad y su interacción).

El análisis factorial se llevó a cabo por un lado, con la ingesta dietética de luteína zeaxantina a partir de frutas, hortalizas y huevos, y, por otro lado, con esas ingestas a partir de alimentos clasificados de acuerdo a su color. Para evaluar la ingesta de frutas, hortalizas y huevos, y debido a la concentración de luteína y zeaxantina en los huevos se expresa en forma conjunta, los datos sobre ingesta de luteína y zeaxantina introdujeron en el análisis factorial como luteína+zeaxantina. Al no encontrar influencia de la ingesta a partir de huevos sobre el DOPM en el análisis factorial ni en el modelo lineal general, y dado que para el resto de los alimentos existen datos separados de ingesta para luteína y zeaxantina, se realizó el análisis de las ingestas individuales de luteína y zeaxantina a partir de frutas y hortalizas.

Todos los P-valores reportados se basan en una prueba exacta de Monte Carlo y en una prueba de dos-lados, y se compararon con un nivel de significación del 5%.

La **relación entre la DOPM y la sensibilidad al contraste** (es la inversa del umbral de contraste). Las correlaciones entre SC y DOPM, la ingesta de frutas y verduras y la luteína+zeaxantina/colesterol+triglicéridos en suero

se establecieron utilizando el coeficiente de correlación rho de Spearman. Se utilizó, como modelo estadístico el modelo lineal general (MLG, distribución TWEEDIE y ENLACE = LOG), con la SC (seis niveles de estímulos, grados de ángulo visual) como la variable dependiente y con factores fijos (sexo, edad) y covariables (ingesta de frutas y hortalizas, y concentraciones séricas de luteína y luteína+zeaxantina/colesterol+triglicéridos, y DOPM).

Las variables evaluadas como posibles predictores de la respuesta SC fueron los parámetros bioquímicos (concentraciones séricas de luteína y luteína + zeaxantina / colesterol + triglicéridos) y el sexo y la edad, (ya que demostraron ser predictores de DOPM en estos sujetos), así como la ingesta de fruta y hortalizas [porque, entre las variables bioquímicas y dietéticas, fue la variable que mostró el más alto coeficiente de correlación con DOPM ($\rho = 0,350$)], como fue descrito con anterioridad (Olmedilla-Alonso *et al.* 2014) y DOPM. Se observó interacción para el umbral de contraste (con y sin deslumbramiento), que fue influenciado por la edad y el sexo en el grupo de sujetos mayores.

RESULTADOS

Capítulo 1: Efecto de la ingesta de luteína, zeaxantina y carotenoides provitamínicos sobre el estatus nutricional.

1. Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición Hospitalaria* 2012; 27(4): 1334-1343.
2. Software application for the calculation of dietary intake of individual carotenoids and of its contribution to vitamin A intake. *Nutrición Hospitalaria* 2013; 28(4): 823-829.
3. Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women: dietary intake, serum concentrations, lipid profile and macular pigment optical density. *Nutrition Journal* 2014; 13.
4. The importance of the food source and its color in the relationship between lutein and zeaxanthin intake from fruit, vegetable and eggs and their associations with nutritional status and the macular pigment optical density in Spanish subjects. *British Journal of Nutrition* (Enviado 21 de Julio de 2015, en Revisión. Manuscript ID: BJN-RA-15-0791)

5. Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in major β -cryptoxanthin food contributors to its intake in the Spanish population. Food & Function (Enviado 13 de Octubre de 2015. Manuscript ID: FO-ART-10-2015-001242).

Original

Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes

Beatriz Beltrán¹, Rocío Estévez², Carmen Cuadrado¹, Susana Jiménez² y Begoña Olmedilla Alonso²

¹Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. ²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC). Madrid. España.

Resumen

Objetivos: 1) Elaborar una base de datos de carotenoides (BD-carotenoides) de alimentos consumidos en España. 2) Valorar el estado nutricional en vitamina A (expresada en equivalentes de retinol (ER) y en equivalentes de actividad de retinol (EAR)) en adultos jóvenes.

Métodos: La BD-carotenoides incluye datos de carotenos (β -caroteno, α -caroteno y licopeno) y xantofilas (β -criptoxantina, luteína y zeaxantina) generados mediante HPLC.

La ingesta de vitamina A se valoró a partir de tres recuerdos de 24 horas, en 54 adultos, 20-35 años, no obesos y con retinol sérico ($> 30 \mu\text{g/dl}$), utilizando la BD-carotenoides y unas Tablas de Composición de Alimentos de amplio uso en España.

Resultados: La BD-carotenoides incluye datos para 89 alimentos (9 en crudo y cocido y 14 son alimentos procesados). La ingesta de carotenoides provitamínicos-A es de $2,5 \text{ mg/p/d}$, la de ER $682 \mu\text{g/p/d}$ y la de EAR $499 \mu\text{g/p/d}$. La vitamina A expresada en EAR es un 27% inferior que como ER. El 76% de las ingestas se adecuan a las ingestas recomendadas y el 63% a la ingesta diaria recomendada.

Conclusiones: Los datos individualizados de carotenoides permiten mayor precisión en los estudios entre dieta y salud, y facilitan la valoración de la ingesta de vitamina A, expresada en ER, EAR o en otras formas de expresión futuras. La ingesta de vitamina A expresada como EAR implica una reducción importante en la contribución de los carotenoides a la ingesta de vitamina A, lo que conlleva un aumento en la detección de inadecuaciones en la ingesta de esta vitamina.

(Nutr Hosp. 2012;27:1334-1343)

DOI:10.3305/nh.2012.27.4.5886

Palabras clave: Vitamina A. Carotenoides. Carotenos. Xantofilas. Estatus nutricional.

CAROTENOID DATA BASE TO ASSESS DIETARY INTAKE OF CAROTENES, XANTHOPHYLLS AND VITAMIN A; ITS USE IN A COMPARATIVE STUDY OF VITAMIN A NUTRITIONAL STATUS IN YOUNG ADULTS

Abstract

Objectives: 1) Develop a database of carotenoids (BD-carotenoids) in foods widely consumed in Spain. 2) To assess the vitamin A nutritional status (expressed as retinol equivalents [RE] and retinol activity equivalents [RAE]) in young adults.

Methods: The BD-carotenoids includes data on carotenoids (β -carotene, α -carotene and lycopene) and xanthophylls (β -cryptoxanthin, lutein and zeaxanthin) generated by HPLC.

Vitamin A intake was assessed by a 3-day food record in 54 adults (20-35 years of age, not obese and with serum retinol $> 30 \mu\text{g/dl}$), using the BD-carotenoids and a Food Composition Table widely used in Spain.

Results: The BD-carotenoids includes data on 89 foods (9 raw or boiled and 14 processed). The intake of provitamin-A carotenoids is 2.5 mg/p/d , that of RE $682 \mu\text{g/p/d}$ and that of RAE $499 \mu\text{g/p/d}$. The vitamin A intake expressed as RAE is 27% lower than that expressed as RE. Seventy-six percent of the intake meets the daily intake recommendations and 63% meets the reference daily intakes of vitamin A.

Conclusions: Data on individual carotenoids ensure greater accuracy in studies on diet and health, and provide easier assessment of the vitamin A intake, expressed as RE, RAE, or any other future forms. The vitamin A intake expressed as RAE represents a substantial reduction in the carotenoid contribution to vitamin A intake, which enhances the detection of inadequacies of that intake.

(Nutr Hosp. 2012;27:1334-1343)

DOI:10.3305/nh.2012.27.4.5886

Key words: Vitamin A. Carotenoids. Carotenes. Xanthophylls. Nutritional status.

Correspondencia: Begoña Olmedilla Alonso.
ICTAN. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
C/ José Antonio Novais, 10.
28040 Madrid. España.
E-mail: Bolmedilla@ictan.csic.es

Recibido: 3-IV-2012.
Aceptado: 10-IV-2012.

Abreviaturas

BD-carotenoides: Base de datos de carotenoides.
EAR: Equivalentes de actividad de retinol.
ER: Equivalentes de retinol.
FESNAD: Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética.
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.
RDA: Ingesta diaria recomendada.
IR: Ingestas recomendadas.
TCA: Tablas de composición de alimentos.
TCA-Moreiras: Tabla de composición de alimentos de Moreiras y cols.

Introducción

Los carotenoides son pigmentos liposolubles de origen vegetal que están presentes en el organismo humano, el cual no los sintetiza *de novo* y los obtiene a partir de la dieta. La principal actividad de estos compuestos en las plantas es la fotoprotección del sistema fotosintético, y en el organismo humano destaca, entre otras, la actividad provitamínica A. Esta actividad es la única función reconocida de los carotenoides¹, siendo el β -caroteno, de entre los que poseen dicha capacidad, el que por su estructura tiene un mejor rendimiento en retinol. Además, estos compuestos pueden ejercer otras actividades de importancia en la salud humana, como son la antioxidante², la potenciación del sistema inmune³ y la fotoprotección de tejidos, como el epitelial y el ocular^{4,5}.

En la dieta humana los carotenoides son aportados fundamentalmente por frutas y hortalizas y en pequeña proporción a partir de fuentes animales y a través de los aditivos alimentarios (colorantes). De los casi cincuenta carotenoides disponibles en la dieta humana, que pueden ser absorbidos y metabolizados, sólo seis representan más del 95% de los carotenoides totales en sangre y son los habitualmente estudiados en el contexto dieta y salud humana⁵. La mitad de estos compuestos tienen actividad provitamínica A, son el β -caroteno, el α -caroteno y la β -criptoxantina, y otros tres no tienen dicha capacidad, son el licopeno, la luteína y la zeaxantina.

Una elevada ingesta de frutas y hortalizas está claramente asociada con un menor riesgo de diversas enfermedades crónicas^{6,7,8}, sin embargo, al considerar su contenido en carotenoides, las asociaciones son contradictorias^{9,10}. Una de las razones de estas discrepancias se debe a los numerosos factores que en las tablas de composición de alimentos (TCA) pueden dar lugar a una falta de fiabilidad en los datos (ej. identificación del alimento) y dificultar la comparación de la ingesta (ej. términos usados para referirse a los carotenoides)¹¹.

Tradicionalmente, las TCA han incluido datos de los carotenoides con actividad provitamínica A, expresando su contenido total o su aporte al contenido de

vitamina A en el alimento¹², bien como equivalentes de retinol (ER) o, más recientemente, como equivalentes de actividad de retinol (EAR). Estos datos, en la mayoría de las TCA elaboradas en España son bibliográficos^{12,13,14,15,16}, pocas incluyen datos analíticos¹⁷. Por otra parte, aunque todavía muy pocas TCA ofrecen datos individualizados de carotenoides, con y sin actividad provitamínica^{18,19,20,21}, debido al, cada vez mayor, número de estudios sobre la actividad biológica de los diferentes carotenoides en relación con la salud humana (ej. luteína y zeaxantina en función visual, licopeno en relación con sistema cardiovascular), la información que ofrecen se está ampliando y también mejorando su fiabilidad al incluir datos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que permite la separación individualizada de carotenoides, incluso de formas *trans* y *cis*, y por tanto, facilita el cálculo de la actividad vitamínica del alimento. Finalmente, es importante resaltar que hay pocos datos sobre el contenido en luteína y zeaxantina individualmente¹⁸, ya que se han analizado en general de forma conjunta debido a la dificultad analítica de su separación⁵. Un mayor detalle en el contenido individualizado de carotenoides en los alimentos contribuirá a una mejor comprensión de su papel en la relación dieta y salud.

El presente trabajo tiene dos objetivos: elaborar una base de datos de carotenoides de alimentos consumidos en España a partir de datos analíticos para la mayoría de los alimentos, y utilizar esta base de datos en la valoración del estado nutricional en vitamina A (expresada como ER y EAR) de un grupo de adultos jóvenes en un estudio comparativo con las TCA de Moreiras y cols.¹², ampliamente utilizadas en España.

Material y métodos

Base de datos de carotenoides (BD-carotenoides)

Para la compilación de datos de carotenoides se han usado los siguientes criterios:

- Carotenoides: se han incluido aquellos habitualmente estudiados en el contexto dieta y salud humana. Desde el punto de vista de estructura química, tres de ellos son carotenos o carotenoides hidrocarburos: β -caroteno, α -caroteno y α -criptoxantina, y otros tres xantofilas u oxicarotenos: luteína, zeaxantina y licopeno. Desde el punto de vista nutricional, tres poseen actividad provitamínica A: β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, y otros tres no muestran esta actividad: luteína, zeaxantina, licopeno.

La contribución de los carotenoides a la ingesta de vitamina A, se ha expresado como ER²² y como EAR¹.

$$\text{ER } (\mu\text{g/día}) = \text{retinol} + (\beta\text{-caroteno}/6) + (\alpha\text{-caroteno}/12) + (\beta\text{-criptoxantina}/12).$$

EAR ($\mu\text{g}/\text{día}$) = retinol + (β -caroteno/12) + (α -caroteno/24) + (β -criptoxantina/24).

- b) Alimentos: se han incluido frutas y hortalizas, mayoritariamente, y también productos lácteos por constituir los aportes principales a la ingesta de carotenoides en Europa⁵, así como el aceite de oliva y los huevos porque su consumo cuantitativo en la población española²³ podría influir en la ingesta total de carotenoides. Se incluyen datos de los alimentos en forma cruda, tras proceso de cocción o procesados industrialmente.
- c) Tipo de datos: se incluyen principalmente datos analíticos generados en España y se completan con datos bibliográficos obtenidos mediante HPLC por ser la técnica de elección para este tipo de análisis²⁴. Así, la base de datos se ha construido principalmente a partir de datos analíticos propios ya publicados^{25,26,27} y otros generados para esta BD-carotenoides siguiendo el mismo procedimiento analítico (valorado como “altamente aceptable”)¹⁸. Se completa la información con datos bibliográficos europeos²¹ y de EEUU^{19,20} que muestran el contenido de luteína y zeaxantina de forma conjunta.

Estudio comparativo de la ingesta de vitamina A en adultos jóvenes

La ingesta de vitamina A a partir de carotenoides se ha calculado mediante la BD-carotenoides, expresada en ER y EAR, y utilizando las TCA de Moreiras y cols.¹² (TCA-Moreiras), que aporta datos bibliográficos de “carotenos provitamínicos totales”, de retinol y de ER, de más de quinientos alimentos (generalmente, en crudo).

El contenido de retinol (preformado) se ha tomado de las TCA-Moreiras, por haber sido las utilizadas en numerosos estudios de nutrición y alimentación nacionales^{28,29} e internacionales^{30,31}. Para el cálculo de los ER, las TCA-Moreiras introducen una modificación en la fórmula inicial²², ya que la contribución de los carotenoides provitamínicos aportados por productos lácteos la divide entre dos y los aportados por el resto de alimentos entre seis.

La ingesta dietética reciente se valoró a partir de tres recuerdos de 24 h, uno de ellos coincidiendo con un día festivo, realizados en un período de 7 a 10 días. El primer recuerdo se llevó a cabo de forma presencial mediante un entrevistador especializado, normalmente el mismo que, en días posteriores realizó telefónicamente los otros dos recuerdos. Las cantidades consumidas se estimaron en unidades (frutas), raciones y medidas caseras estandarizadas para este estudio¹². A partir de esta información se calculó la ingesta de alimentos en gramos/día y a partir de ésta se determinó la ingesta diaria de vitamina A expresándola en ER y en EAR.

Sujetos

Participaron en el estudio 54 adultos jóvenes, 27 hombres y 27 mujeres, con edades comprendidas entre 20 y 35 años, con un índice de masa corporal inferior a 30 kg/m², con retinol sérico en rango de normalidad (30-80 $\mu\text{g}/\text{dl}$; determinado mediante HPLC) y que consumían dietas variadas.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda y los voluntarios firmaron el consentimiento informado antes del inicio del estudio.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como valor medio y desviación estándar ya que muestran una distribución normal, excepto en el caso de la vitamina A expresada como ER calculada a partir de la BD-carotenoides, para la cual se aporta además el valor de la mediana.

Para comparar los resultados de la ingesta de vitamina A, expresadas en ER (dos tipos de cálculo) y en EAR, se utilizó el test de Wilcoxon. La correlación entre dichas variables se valoró mediante el coeficiente de Spearman. El nivel de significación estadística se estableció para un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico SPSS.v 19 (SPSS Inc., Chicago, IL. EE.UU.).

Resultados

Base de datos de carotenoides

En la tabla I se muestran 124 entradas de 89 alimentos diferentes; para cada una de ellas se indica la composición individualizada en carotenos (α -caroteno, β -caroteno y licopeno) y xantofilas (luteína, zeaxantina y β -criptoxantina), así como el nombre científico binomial de la especie de que proceden, el porcentaje de porción comestible analizado, la referencia bibliográfica del dato y, finalmente, el valor de vitamina A aportado por los carotenoides provitamínicos A (α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina) expresado en ER y en EAR. La concentración de luteína y zeaxantina se ofrece de forma individualizada para la mayoría de los alimentos, pero no para todos, ya que debido a la dificultad de su separación analítica, en la bibliografía se encuentran frecuentemente cuantificados de forma conjunta⁵. Por ello, y para posibilitar la comparación con otros datos de la bibliografía, se ha incluido en la tabla una columna con la concentración de luteína más zeaxantina.

De las 124 entradas en dicha tabla, 70 proceden de datos analíticos propios^{25,26,27}, 29 son datos procedentes de bibliografía europea²¹, 25 de bibliografía de EEUU^{18,19,20}. De todos ellos, 9 aparecen tanto en crudo como en cocinado, y 14 procesados de diferentes formas como en zumo, congelados, enlatados o en conserva.

Tabla I
Contenido en carotenos y xantofilas de alimentos consumidos en España, expresados en μ g/100 g de porción comestible

Alimento (variedad o procesamiento)	Nombre científico (binomial)	PC	Luteína	Zeaxantina	Lut+Zeax	Licopeno	α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	ER-carot	EAR-carot	Ref.
<i>Alimentos de origen vegetal</i>												
Aceite de oliva virgen (hojiblanca)	Olea europaea	100	599	–	599	–	–	219		37	18	18
Aceite de oliva virgen (picual)	Olea europaea	100	934	–	934	–	–	233		39	19	18
Aceitunas con hueso (verdes en vinagre y enlatadas)	Olea europaea						–	207	4	35	17	19
Acelgas, tallos y hojas (cocidas)	Beta vulgaris	88	1.960	–	1.960	–	–	1.360	–	227	113	25
Acelgas, tallos y hojas (crudas)	Beta vulgaris	88	1.503	–	1.503	–	–	1.095	–	183	91	25
Aguacate	Persea americana	72	314	–	–	–	29	81	40	19	8	26
Albaricoque	Prunus armeniaca L.	93	tr	tr	tr	–	–	140	28	26	13	26
Albaricoque desecado (orejones)	Prunus armeniaca L.				67*		9	827	38	142	71	21
Alcachofa (cocida)	Cynara scolymus L.	47	275	–	275	–	–	59	–	10	5	25
Alcachofa (cruda)	Cynara scolymus L.	47	163	–	163	–	–	47	–	8	4	25
Alcaparras	Capparis spinosa						–	83	–	14	7	19
Apio blanco (crudo)	Apium graveolens	88	163	–	163	–	–	65	–	11	5	27
Apio verde (cocido)	Apium graveolens	85	1.335	–	1.335	–	–	1.109	–	185	92	27
Apio verde (crudo)	Apium graveolens	85	860	–	860	–	–	570	–	95	48	27
Arándano	Vaccinium myrtillus						–	204		34	17	21
Batata	Ipomoea batatas				0*	–	–	9.488	0	1.581	791	19
Bayas de Gogi	Lycium barbarum	100	311	3.260	3.570	–	–	483	1.100	172	86	A
Berenjena (cruda)	Solanum melongena				900*			50		8	4	21
Berros (crudos)	Nasturtium officinale				10.713*			5.919		987	493	21
Brécol (cocido)	Brassica oleracea	97	1.043	–	1.043	–	1	450	–	75	38	27
Brécol (crudo)	Brassica oleracea	97	1.108	–	1.108	–	–	414	–	69	35	27
Calabacín (cocido)	Cucurbita pepo L.	79	169	–	169	–	–	26	11	5	3	25
Calabacín (crudo)	Cucurbita pepo L.	79	108	–	108	–	–	23	6	4	2	25
Calabaza (cocida)	Cucurbita maxima				630*			490	60	87	43	21
Calabaza redondeada (cruda)	Cucurbita maxima		623	–	623	–	31	188	–	34	17	A
Calabaza alargada (cruda)	Cucurbita maxima		728	–	728	–	53	692	–	120	60	A
Canónigos (crudo)	Valerianella locusta	100	4.357	–	4.357	–	–	2.655	–	442	221	A
Caqui	Diospyros Kaki				834*	158		253	1.447	163	81	19
Cardo (crudo)	Cynara cardunculus	100					49	3.954		663	332	19
Cebolla (cocida)	Allium cepa L.	89	5	tr	5	–	–	3	–	1	0	25
Cebolla (cruda)	Allium cepa L.	89	2	tr	2	–	–	1	–	0	0	25
Cebolleta (cruda)	Allium fistulosum L.				255*			142		24	12	21
Cerezas	Prunus avium	85	44	4	48	10	2	13	5	3	1	26
Champiñón (crudo o cocido)	Agaricus bisporus				–	–		–		0	0	21
Ciruela amarilla	Prunus domestica L.	92	83	–	83	–	–	117	–	20	10	26
Col rizada (cocida)	Brassica olearacia				15.798*	–	–	6.202	–	1.034	517	19
Coles (hoja oscura, tipo berza) (crudas)	Brassica olearacia L.				8.091*	–	90	4.418	20	746	373	19
Coles de Bruselas (cocidas)	Brassica olearacia L.	80	468	–	468	–	–	162	–	27	14	25
Coles de Bruselas (crudas)	Brassica olearacia L.	80	185	–	185	–	–	77	–	13	6	25
Coliflor (cocida)	Brassica olearacia L.	84	15	tr	15	–	–	7	–	1	1	25
Coliflor (cruda)	Brassica olearacia L.	84	4	–	4	–	–	2	–	0	0	25

Tabla I (cont.)
Contenido en carotenos y xantofilas de alimentos consumidos en España, expresados en μ g/100 g de porción comestible

Alimento (variedad o procesamiento)	Nombre científico (binomial)	PC	Luteína	Zeaxantina	Lut+Zeax	Licopeno	α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	ER-carot	EAR-carot	Ref.
Espárragos verdes (cocidos)	Asparagus officinalis	50	738	–	738	–	–	387	–	65	32	25
Espárragos verdes (crudos)	Asparagus officinalis	50	609	–	609	–	–	320	–	53	27	25
Espinacas (cocidas)	Spinacia oleracea L.	76	6.422	564	6.986	–	–	4.626	–	771	386	25
Espinacas (crudas)	Spinacia oleracea L.	76	4.229	377	4.606	–	–	3.254	–	542	271	25
Frambuesa	Rubus idaeus L.				–		12	8		2	1	19
Fresón	Fragaria vesca	96	14	tr	14	–	–	4	–	1	0	26
Grellos y nabizas (cocidas)	Brassica napus				8.440*	–	–	4.575	–	763	381	19
Guisantes (cocidos)	Pisum sativum				1.840*		–	548		91	46	21
Guisantes congelados	Pisum sativum					33		320		56	28	19
Guisantes en conserva	Pisum sativum				1.350*	–	–	320	–	53	27	19
Habas en grano (cocidas)	Vicia faba				654*			406		68	34	21
Judías verdes (cocidas)	Phaseolus vulgaris L.	93	487	–	487	–	79	238	–	46	23	25
Judías verdes (crudas)	Phaseolus vulgaris L.	93	365	–	365	–	35	166	–	31	15	25
Ketchup		210*	9.900		5.000		833	417	21			
Kiwi amarillo	Actinidia chinensis		41	–	41	–	–	32	–	5	3	A
Kiwi verde	Actinidia chinensis	66	96	–	96	–	–	16	–	3	1	26
Lechuga romana (cruda)	Lactuca sativa L.	50	340	–	340	–	–	172	–	29	14	25
Lechuga tipo iceberg (cruda)	Lactuca sativa L.	88	140	–	140	–	–	48	–	8	4	25
Limón	Citrus limon	60	2	1	3	–	tr	–	14	1	1	26
Lombarda (cocida)	Brassica oleracea	81	23	4	27	–	–	7	tr	1	1	25
Lombarda (cruda)	Brassica oleracea	81	8	tr	8	–	–	3	tr	1	0	25
Macedonia de frutas en almíbar				112*	–	–	138	52	27	14	19	
Macedonia de frutas en su jugo				50*	–	–	20	50	8	4	21	
Maíz (fresco, desgranado)	Zea mays		411	218	628	–	–	–	–	0	0	A
Maíz (dulce desgranado en conserva)	Zea mays				884*	–	33	30	–	8	4	19
Mandarina	Citrus reticulata	73	–	–	–	–	–	213	843	106	53	26
Mango	Magnifera indica L.		–	–	–	–	–	152	–	25	13	A
Manzana	Malus pumila	80	6	tr	6	–	–	20	8	4	2	26
Maracuyá	Passiflora edulis					35		525	46	94	47	19
Margarina		540			90	45	21					
Melocotón	Prunus persica	69	16	31	47	–	3	64	74	17	9	26
Melocotón en almíbar	Prunus persica				33*	–	–	334	141	67	34	19
Melón	Cucumis melo	62	2	tr	2	–	–	21	–	4	2	26
Mora	Rubus ulmifolius					4		78	–	13	7	21
Nabo (crudo)	Brassica rapus				0*			72		12	6	21
Naranja	Citrus sinensis	72	68	66	134	–	13	48	448	46	23	26
Nectarina	Prunus persica					50	30		11	5	21	
Níspero	Eriobotrya japonica	65	–	–	–	–	–	977	663	218	109	26
Papaya	Carica papaya L.				75*	–	–	276	76	52	26	19
Patata (cocida)	Solanum tuberosum,L.	74	44	21	65	–	tr	2	tr	0	0	25
Patata (cruda)	Solanum tuberosum,L.	74	12	4	16	–	tr	1	tr	0	0	25
Pepino (crudo)	Cucumis sativus L.	70	16	–	16	–	–	11	–	2	1	25
Pera	Cucumis sativus L.	80	11	–	11	–	–	2	3	1	0	26

Tabla I (cont.)
Contenido en carotenos y xantofilas de alimentos consumidos en España, expresados en μ g/100 g de porción comestible

Alimento (variedad o procesamiento)	Nombre científico (binomial)	PC	Luteína	Zeaxantina	Lut+Zeax	Licopeno	α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	ER-carot	EAR-carot	Ref.
Pimiento morrón (rojo, cocido)	Capsicum annuum						62	2.220		375	188	19
Pimiento rojo (cocido)	Capsicum annuum	85	–	390	390	–	–	693	371	146	73	25
Pimiento rojo (crudo)	Capsicum annuum	85	–	289	289	–	–	414	251	90	45	25
Pimiento verde (cocido)	Capsicum annuum	95	377	–	377	–	–	255	–	43	21	25
Pimiento verde (crudo)	Capsicum annuum	95	341	–	341	–	–	205	–	34	17	25
Piña	Ananas sativus		–	–	–	–	–	57	–	10	5	A
Piña enlatada en su jugo	Ananas sativus				2*		1	18	2	3	2	21
Plátano	Musa paradisiaca	60	7	–	–	–	63	77	–	18	9	26
Pomelo (amarillo)	Citrus paradisi				8*		6	5	3	2	1	21
Pomelo (rosa)	Citrus paradisi				0*	3.362	–	1.310	–	218	109	21
Puerro (cocido)	Allium porrum L.	35	171	19	190	–	–	99	–	17	8	27
Puerro (crudo)	Allium porrum L.	35	76	5	81	–	–	51	–	9	4	27
Remolacha en conserva	Beta vulgaris					–	–	–	–	0	0	21
Repollo (cocido)	Brassica oleracea L.	81	93	6	99	–	–	33	–	6	3	25
Repollo (crudo)	Brassica oleracea L.	81	59	6	65	–	–	22	–	4	2	25
Rúcula	Diplotaxis tenuifolia L.	100	8.061	–	8.061	–	–	3.575	–	596	298	A
Sandía	Citrullus lanatus	78	40	–	40	2.454	–	77	62	18	9	26
Tamarindo	Tamarindus indica						–	8	–	1	1	19
Tomate al natural enlatado	Lycopersicum esculentum mill.				40*	9.708	–	186	–	31	16	19
Tomate canario (crudo)	Lycopersicum esculentum mill.	95	44	–	44	1.604	–	443	–	74	37	25
Tomate común (crudo)	Lycopersicum esculentum mill.	97	52	–	52	2.116	–	494	–	82	41	25
Tomate frito	Lycopersicum esculentum mill.		114	–	114	14.571	–	315	–	53	26	27
Tomate pera (crudo)	Lycopersicum esculentum mill.	95	72	–	72	62.273	–	393	–	66	33	25
Uvas blancas	Vitis vinifera L.	100	13	–	13	–	–	17	–	3	1	26
Uvas negras	Vitis vinifera L.							39		7	3	19
Yuca o mandioca	Manihot esculenta						–	8	–	1	1	19
Zanahoria (cocida)	Daucus carota L.	85	273	–	273	–	3.245	8.162	–	1.631	815	25
Zanahoria (cruda)	Daucus carota L.	85	288	–	288	–	2.895	6.628	–	1.346	673	25
Zanahoria en conserva	Daucus carota L.					–	3.700	9.800		1.942	971	21
Zumo de naranja comercial	Citrus sinensis L.				138*	–	2	24	99	12	6	19
Zumo de naranja natural	Citrus sinensis L.				27*		6	82	701	73	36	21
Zumo de tomate	Lycopersicon esculentum mill.				30*	9.675		423		71	35	21
<i>Alimentos de origen animal</i>												
Huevo de gallina (crudo)			620*			13		2	1	21		
Leche de vaca entera			20		3	2	21					
Leche de vaca semidesnatada				10		2	1	21				
Mantequilla		410			68	34	21					
Mayonesa comercial			42		7	4	21					
Queso Cheddar		–	–				–	85	–	14	7	19
Yema de huevo (cruda)					1.576*			29		5	2	21
Yogur								13		2	1	21

–: No detectado; Celda vacía: no analizado; *Concentración de luteína + zeaxantina aportada de forma conjunta en la referencia; A = Alimentos analizados para esta base de datos.

En general, los carotenoides con actividad provitamina A son aportados en mayor cantidad por las hortalizas (especialmente, por la zanahoria, berros, coles, batata, grelos y espinacas, que contienen más de 300 µg EAR/100 g de porción comestible), siendo las concentraciones mayores en el alimento cocido que en el fresco. De los alimentos procesados, la salsa ketchup contiene una muy elevada cantidad de β-caroteno (5.000 µg/100 g). En las frutas, el contenido de carotenoides provitamínicos es destacable (más de 70 µg de EAR/100 g) en pomelo, el caqui y el níspero.

En las frutas y hortalizas de color verde o blanco amarillento, la actividad provitamínica se debe fundamentalmente al β-caroteno, mientras que en las de color naranja (ej. naranja, mandarina, caqui) a esta actividad contribuye la β-criptoxantina en mayor medida que el β-caroteno.

Respecto a los carotenoides que no poseen actividad provitamina A, hay que destacar la presencia de luteína, ampliamente distribuida en alimentos vegetales junto con el β-caroteno, en alimentos de color verde, donde está en cantidades superiores a 1.000 µg/100 g, en espinacas, acelgas, apio verde, brécol y en la yema de huevo (datos conjuntos con zeaxantina). La zeaxantina se encuentra en un menor número de alimentos, entre las hortalizas, está en las espinacas, el pimiento rojo y el maíz, y en las frutas, se encuentra en la naranja. El licopeno se encuentra en un limitado número de alimentos como son el tomate, la sandía, el caqui y el pomelo rosa, pero con una gran presencia en alimentos procesados que contienen tomate (ej. tomate frito, pizzas, sopas).

En las ocho entradas de productos de origen animal que se muestran en la tabla I se puede observar que el contenido de carotenoides es muy inferior al presente en productos vegetales. Se puede destacar el contenido de β-caroteno en la mantequilla y de luteína en la yema de huevo.

Evaluación de la ingesta de vitamina A de adultos jóvenes

En la tabla II se muestran los datos de ingesta de carotenoides provitamínicos A, de retinol y de vita-

mina A (expresada como ER y como EAR). A partir de la BD-carotenoides se ha calculado la ingesta de carotenoides provitamínicos (suma de α-caroteno, β-caroteno y β-criptoxantina) y con las TCA-Moreiras tenemos el aporte de "carotenos provitamínicos totales", ambos datos de ingesta no muestran diferencias significativas.

La ingesta de retinol se valoró utilizando las TCA-Moreiras. La ingesta de vitamina A se ha podido expresar como ER y como EAR, cuando se dispone de datos individualizados de carotenoides provitamínicos (en la BD-carotenoides). Los resultados de ingesta de vitamina A, expresada como ER (dos datos) y como EAR, muestran correlaciones significativas ($r > 0,901$). La ingesta de vitamina A, expresada como ER, muestra sólo un 5% de diferencia entre la calculada a partir de la BD-carotenoides o de las TCA-Moreiras, a pesar de que las fórmulas utilizadas son diferentes. En cambio, la ingesta de vitamina A, como EAR es un 27% inferior al valor de ER ($p = 0,000$).

Finalmente, en la tabla II se indica el porcentaje de adecuación de esta ingesta a las ingesta recomendada (IR) para la población española, indicada en las TCA-Moreiras¹² (800 µg/día y 1.000 µg/día de ER para mujeres y hombres, respectivamente) y a la ingesta diaria recomendada (RDA) para la población norteamericana y canadiense¹, expresada en EAR (700 µg/día y 900 µg/día de EAR para mujeres y hombres, respectivamente). Así, la ingesta media de vitamina A de la muestra (expresada como ER) no llega a cubrir las IR para la población española¹². El nivel de inadecuación a la ingesta recomendada es todavía mayor cuando se compara con las actuales RDA¹, expresadas en EAR, ya que en ningún caso se alcanzaría el nivel recomendado.

Discusión

Base de datos de carotenoides

La BD-carotenoides en alimentos proporciona datos individualizados de los seis carotenoides mayoritarios en sangre y, por tanto, facilita la correcta estimación de cada uno de ellos en relación con distintas situaciones

Tabla II
Ingestas de retinol, de carotenoides provitamínicos (µg/día) y de vitamina A total

	<i>Carotenoides provitamínicos-A</i>	<i>Retinol</i>	<i>Vitamina A</i>	
			<i>Equivalentes de retinol (% IR)</i>	<i>Equivalentes de actividad de retinol (% RDA)</i>
BD-carotenoides	2.484 ± 2.443	316.9 ± 222.1	682 ± 430 ^a (76 ± 46)	499 ± 293 (63 ± 36)
TCA-Moreiras y cols.	2.346 ± 2167		716 ± 422 (80 ± 46)	

^aMediana: 555 µg ER/día.

de salud o enfermedad. Esto es de gran importancia ya que, como se ha observado en la última encuesta de nutrición y salud en EEUU, cada uno de ellos tiene diferentes efectos en relación con las causas de mortalidad y además, muestran interacciones entre ellos¹⁰. Además, hay que destacar que en la BD-carotenoides se aportan datos de luteína y zeaxantina de forma independiente para casi todos los alimentos y esto es de gran interés ya que estos compuestos, que se depositan de forma selectiva en retina con distribuciones específicas¹, son recomendados para mejorar la función visual y están siendo utilizados en un extenso estudio para disminuir el riesgo de enfermedades oculares asociadas al envejecimiento³².

Por otra parte, disponer de datos de carotenoides (carotenos y xantofilas) provitamínicos, de forma individualiza, permite una adecuada valoración de la ingesta de vitamina A, expresada en ER, EAR o en otras formas de expresión que puedan plantearse en base al conocimiento sobre su biodisponibilidad y conversión en formas activas.

Todos los datos incluidos en la BD-carotenoides proceden de análisis realizados mediante HPLC, por ser la mejor técnica disponible actualmente y por permitir un mejor cálculo de la ingesta de vitamina A. Los alimentos incluidos son fundamentalmente de origen vegetal, ya que frutas y hortalizas son los principales contribuyentes a la ingesta de carotenoides en la mayoría de las dietas y, además, los alimentos vegetales aportan alrededor del 25-35% de la ingesta total de vitamina A o incluso más, hasta el 82% en países en desarrollo²⁴.

Aunque la mayoría de los datos de la BD-carotenoides proceden de análisis propios de frutas y hortalizas comercializadas en España^{25,26,27}, analizadas en crudo y también cocidas (aquellas que no se consumen crudas), también se han incorporado datos bibliográficos de algunos alimentos de amplio consumo en la población española según la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética de 2011²³, como es el aceite de oliva. El aceite elaborado con la variedad picual es el más extendido en España y contiene luteína (934 µg/100 g) y β-caroteno (233 µg/100 g). Este aceite se puede considerar una buena fuente de luteína, ya que el consumo medio nacional de 23 g aceite/día²³, asumiendo que todo fuese de oliva, aportaría unos 215 µg luteína/día, cantidad superior a la aportada por la ingesta media de espinacas²³ (alimento con elevado contenido en luteína). También se han incluido en la BD-carotenoides algunos alimentos de origen animal, como son los lácteos, el huevo y derivados, que aunque tienen un bajo contenido en carotenoides, debido a su elevado consumo²³, pueden llegar a tener una contribución significativa a la ingesta de algunos carotenoides, como por ejemplo el α-caroteno²¹ o la luteína en el caso del huevo, que puede llegar a aportar 151 µg luteína/día (calculado en base a un consumo medio de 24,3 g huevo/día), cantidad equiparable a la aportada por la ingesta media diaria de espinacas. Finalmente, las bayas de Goji (o bayas del

Tíbet) se han incluido por el elevado contenido en zeaxantina (3.260 µg/100 g), carotenoide escasamente presente en nuestra dieta, y por su amplia difusión en el mercado español en los últimos años.

Los carotenoides habitualmente presentes en frutas y hortalizas son el β-caroteno y la luteína. El licopeno se encuentra en pocos alimentos de forma natural, pero está presente en numerosos platos (recetas) y alimentos procesados a los que se añade tomate. El licopeno en poblaciones europeas es aportado fundamentalmente por el tomate y derivados²¹ durante todo el año, y de forma estacional, en la población española, por la sandía³³ y el caqui. En cuanto a la β-criptoxantina, es aportada por naranjas/mandarinas, pimiento rojo y por alimentos de presencia en aumento en el mercado español, como el caqui.

Hay numerosas bases de datos de composición de alimentos, pero en general, no contienen información sobre carotenoides. En Europa, el proyecto EuroFIR tuvo como objetivo crear una plataforma europea de bases de datos de composición de alimentos y entre los países participantes está España, donde en 2006 se comenzó la elaboración de la Base Española de Datos de Composición de Alimentos¹⁵ y en ella se espera integrar los datos aquí presentados.

Evaluación de la ingesta de vitamina A en adultos jóvenes

Para el cálculo de ingesta de vitamina A se han utilizado dos tablas/base de datos diferentes, que comparan los datos de retinol pero no los de carotenoides. Según estas fuentes, la ingesta de carotenoides provitamínicos no es significativamente diferente y por tanto, tampoco lo es la de vitamina A, expresado como ER. En cambio, la contribución de los carotenoides provitamínicos a la ingesta de vitamina A es significativamente inferior cuando se expresa como EAR que cuando se expresa como ER (35,5 ± 20,9% vs 49 ± 22,8%, respectivamente). La diferencia de los EAR frente a los ER (27%) se debe a la menor contribución (la mitad) de los carotenoides provitamínicos en el cálculo de los EAR frente a los ER.

La ingesta de vitamina A (ER) es semejante a la descrita en otros estudios españoles y refleja dietas en las que el retinol preformado (fuentes animales) es el principal componente de la vitamina A ingerida, como ocurre en otras poblaciones occidentales^{34,35}. Sin embargo, en aquellos patrones alimentarios con elevada ingesta de frutas y hortalizas, en cuyo contenido predomine la β-criptoxantina (abundante en frutas), debido al factor aplicado al cálculo de la contribución a la ingesta de EAR, podría dar lugar a la infravaloración de la ingesta de esta vitamina³⁶.

La ingesta de carotenoides provitamínicos (α-caroteno, β-caroteno, β-criptoxantina) es de 2,5 mg/persona/día, similar a la encontrada en otros estudios en población española^{21,37}, algo superior a la descrita a

nivel poblacional en España (1,6 mg/p/día)³³ e inferior a la descrita en otros países²¹. Una adecuada comparación de los datos de ingesta de carotenoides requiere que su contenido en alimentos haya sido analizado mediante HPLC, ya que de lo contrario hay una infraestimación (aprox. 30-50%) de su ingesta¹¹.

En el grupo de adultos jóvenes, la ingesta de vitamina A no alcanza la IR de vitamina A para la población española propuesta por Moreiras¹², ya que sería un 20-24% inferior si consideramos ER y un 37% menor si se expresa en EAR, pero sí consume el nivel recomendado recientemente por la Federación Española de Sociedades de Nutrición Alimentación y Dietética³⁹, 700 y 600 µg vitamina A al día (expresada como ER), para hombres y mujeres respectivamente. Sin embargo, la vitamina A en sangre (concentración de retinol) de estos sujetos está dentro del rango de normalidad (media = 56,7 ± 14,5 µg/dL datos que serán objeto de otra publicación). Este hecho se observa frecuentemente en otros grupos de población española cuando se estudia el estado nutricional en vitamina A, el cual se encuentra en niveles por debajo del rango deseable cuando está valorado mediante métodos dietéticos^{36,39}, sin embargo, cuando para la valoración del estado nutricional se considera el marcador bioquímico, la concentración de retinol en sangre está dentro del rango de normalidad (en general, en el segundo o tercer tercil)^{39,40,41,42}. Por todo ello, quizás habría que cuestionar si el nivel las IR para vitamina A está sobreestimado o si la contribución de todos o de algunos de los carotenoides provitamínicos a la ingesta de vitamina A está infravalorada.

Conclusiones

Los estudios sobre dieta y salud requieren información individualizada de los componentes de los alimentos y en esta BD-carotenoides se facilita información sobre los principales carotenoides, con y sin actividad provitamínica A, presente en la dieta y en el organismo humano.

La ingesta de vitamina A expresada como equivalentes en actividad en retinol (EAR) implica una reducción importante en la contribución de los carotenoides a la ingesta de vitamina A, lo que conlleva un aumento en la detección de inadecuaciones en la ingesta de esta vitamina, que no suele confirmarse al utilizar marcadores bioquímicos (retinol en sangre). Consideramos que se debería cuestionar la adecuación de los valores de ingesta dietética recomendada de vitamina A, así como también la contribución de los carotenoides provitamínicos a la actividad en retinol según los tipos de dieta.

Agradecimientos

Se agradece la financiación de la Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de

Ciencia e Innovación Tecnológica) (PS09/00681). Rocío Estévez Santiago es becaria del CSIC en la modalidad JAE-Predoc del Programa Junta para la Ampliación de Estudios cofinanciada por el FSE.

Referencias

1. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. 2000; National Academy Press. Washington DC.
2. Rao A, Rao L. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res* 2007; 55: 207-216.
3. Chew B, Park J. Carotenoid action on the immune response. *J Nutr* 2004; 134 (1): 257S-261S.
4. Sthal W, Sies H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Mol Biotechnol* 2007; 37: 26-30.
5. Maiani G, Periago-Castón M, Catasta G, Toti E, Goñi-Cambrodón I, Bysted A. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: S194-S218.
6. Bazzano L, He J, Ogden L, Liria C, Vupputuri S, Myers L, Whelton P. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiological Follow-up Study. *Am J Clin Nutr* 2002; 76 (1): 93-99.
7. Hung HC, Joshipura K, Jiang R, Hu F, Hunter D, Smith-Warner S. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96 (21): 1577-1584.
8. Martínez-González M, de la Fuente-Arrillaga C, López del Burgo C, Ruiz-Canela M, Benito S. Low consumption of fruit and vegetables and risk of chronic disease: a review of the epidemiological evidence and temporal trends among Spanish graduates. *Public Health Nutr* 2011; 14 (12A): 2309-2315.
9. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen T. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 2006; 83 (6): 1265-1271.
10. Shardell M, Alley D, Hick G, El-Kamary S. Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr Res* 2011; 31: 178-189.
11. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Gil Martínez E, Rojas Hidalgo E. Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: A user's point of view. *Crit Rev Food Sci & Nutr* 1997; 37 (7): 621-633.
12. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de Composición de Alimentos. 2009; 14ª edición. Ediciones Pirámide. Madrid.
13. Centre d'Ensenyament Superior de Nutrició i Dietètica, CES-NID. Tablas de composición de alimentos/Taules de composició d'aliments. Coordinadas por el Dr. Andreu Farran. 2009; McGraw-Hill, Interamericana y Edicions de la Universitat de Barcelona. Barcelona.
14. Mataix J, Mañas M, Llopis J, Martínez de Victoria E. Tablas de composición de Alimentos Españoles. 2003; Universidad de Granada. Granada.
15. Base Española de Datos de Composición de Alimentos (BEDCA). [base de datos en Internet] RedBEDCA y AESAN. [consultado en febrero de 2012] www.bedca.net
16. Martínez Burgos M A, Martínez- Victoria I, Milá R, Farrán A, Farré R, Ros G. Building a unified Spanish food database according to EuroFIR specifications. *Food Chemistry* 2009; 113: 784-788.
17. Requejo A, Ortega R, Andrés P, Ruiz F, Sánchez-Muniz F, González-Fernández M. Tablas de composición de alimentos españoles. Edición coordinada por Carretero ML y Gómez MD. 2004; Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
18. West, CE y Poortvliet, EJ. The carotenoid content of foods with special reference to developing countries. 1993; VITAL, International Science and Technology Institute. Arlington, Virginia.

19. Holden J, Eldrige A, Beecher G, Buzzard I, Bhagwat S, Davis C. Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. *J Food Comp Anal* 1999; 12: 169-196.
20. USDA-NCC Carotenoid Database for U.S. Foods. 1998. [base de datos en Internet] Agricultural research service, U.S. Department of Agriculture [Consultado el: 25 de febrero de 2012.] <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/car98/car98.html>
21. O'Neill M, Carroll Y, Corridan B, Olmedilla B, Granado F, Blanco I. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br J Nutr* 2001; 85: 499-507.
22. Joint FAO/WHO Expert consultation. Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12. 1988; Rome: FAO Food and Nutrition Series, nº 23.
23. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Encuesta nacional de la Ingesta Dietética Española 2011. [En línea] 2011. Accedido 22/02/2012 http://www.aesan.mspsi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/datos_consumo/ENIDE.pdf
24. Rodríguez Amaya, D. Análisis de carotenoides. En Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. 1997; C. Morón, I. Zacarías, & S. de Pablo. Santiago (Chile): Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO).
25. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas Hidalgo E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 2135-2140.
26. Olmedilla, B, Granado, F y Rojas-Hidalgo, E. Quantitation of provitamin and non provitamin A carotenoids in fruits most frequently consumed in Spain. En: Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects, 1993; K Waldrom, IT Johnson y Fenwic GK. págs. 141-145.
27. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Gil-Martínez E. Carotenoid content in fruit and vegetables and its relevance to human health: Some of the factors involved. *Recent Res Devel in Agricultural & Food Chem* 1998; 2 (1): 57-70.
28. Varela-Moreiras G, Avila JM, Cuadrado C, del Pozo S, Ruiz E, Moreiras O. Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the food Consumption Survey: updated information. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: S37-S43.
29. Varela G, Moreiras O, Carbajal A, Campo M. Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación 1991. Encuesta de Presupuestos Familiares 1990-91. 1995; Instituto Nacional de Estadística. Madrid.
30. Del Pozo S, Cuadrado C, Moreiras O. Age-related changes in the dietary intake of elderly individuals. The Euronut-SENECA study. *Nutr Hosp* 2003; 18 (6): 348-352.
31. Rodríguez Sangrador M, Beltrán de Miguel B, Cuadrado Vives C, Moreiras Tuni O. Comparative analysis of vitamin D status and solar exposition habits in adolescent and elderly Spanish women. The Five Countries Study (OPTIFORD Project). *Nutr Hosp* 2011; 26 (3): 609-613.
32. AREDS2 (Age-Related Eye Disease Study 2) . [En línea] [Consultado el: 20 de Febrero de 2012.] www.areds2.org .
33. Granado F, Blázquez S, Olmedilla B. Changes in carotenoid intake from fruit and vegetables in Spanish population over the period 1964 - 2004. *Pulic Health Nutrition* 2007; 10 (10): 1018-1023.
34. Capita R, Alonso-Calleja C. Evaluation of vitamin and mineral intakes and impact of snack foods on Spanish Population. *Nutrition Research* 2006; 26: 255-265.
35. Ortega RM, Aranceta J, Serra-Majem, Entrala A, Gil A, Mena MC. Nutritional risks in the spanish population: results of the eVe study. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57 (1): S73-75.
36. Burri B, Chang J, Neidlinger T. β -Cryptoxanthin- and α -carotene-rich foods have greater apparent bioavailability than -carotene-rich foods in Western diets. *Br J Nutr* 2011; 105: 212-219.
37. Gómez-Aracena. Vegetable consumption and carotenoids in plasma and adipose tissue in Malaga, Spain. *Int J Vitam Nutr Res* 2003; 73 (1): 24-31.
38. Serra Majem L, Ribas Barba L, Salvador Castell G, Román Viñas B, Castell Abat C, Cabezas Peña. Tendencias del estado nutricional de la población española: Resultados del sistema de monitorización nutricional de Cataluña (1992-2003). *Rev Esp Salud Pública* 2007; 81: 559-570.
39. Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española. 2010; EUNSA. Pamplona.
40. Olmedilla B, Granado F, Gil Martínez E, Blanco I, Rojas Hidalgo E. Reference values for retinol, alpha tocopherol and main carotenoids in serum of control and insulin dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem* 1997; 43 (6): 1066-1071.
41. Su L, Bui M, Kardinaal A, Gómez-Aracena J, Martin B, Thamm M. Differences between plasma and adipose tissue biomarkers of carotenoids and tocopherols. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1998; 7: 1043-1048.
42. Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright A, Blanco I, Gil-Martínez E. Serum concentrations of carotenoids, vitamins A, E, and C, in control subjects from five European countries. *Brit J Nutr* 2001; 85: 227-238.



Original

Software application for the calculation of dietary intake of individual carotenoids and of its contribution to vitamin A intake

Rocío Estévez-Santiago¹, Beatriz Beltrán-de-Miguel², Carmen Cuadrado-Vives² and Begoña Olmedilla-Alonso¹

¹Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). Madrid, Spain. ²Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

Abstract

Introduction: The software applications utilized to assess dietary intake usually focus on macro- and micronutrients, but not on other components of the diet with potential beneficial effects on health, which include the carotenoids. The degree to which each carotenoid exerts diverse biological activities differs and, thus, it is in our interest to know their composition in foods on an individual basis.

Objective: To develop a software application with individualized data on carotenoids that enables the calculation of their dietary intake and consultation of the contents of these compounds in foods.

Material and methods: Software application developed with Java 7, which includes a database of the carotenoids (lutein, zeaxanthin, lycopene, β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene) in foods (including those that are major contributors to carotenoid intake in Europe), generated by HPLC. The variables include those relative to the foods, subjects and diets that are necessary to provide accurate information on the content of carotenoids in foods and to enable the calculation of their intake.

Results: The software application enables the calculation of the dietary intake of individual carotenoids from 128 foods (raw and cooked), and their contribution to vitamin A intake, in the two forms employed at the present time: retinol equivalents (RE) and retinol activity equivalents (RAE).

Conclusions: This software application is a dynamic, specific and accurate tool for the consultation of carotenoid concentrations in foods and the calculation of their intake, aspects that are essential in research studies on diet and health.

(Nutr Hosp. 2013;28:823-829)

DOI:10.3305/nh.2013.28.3.6451

Key words: *Software design. Carotenoids. Vitamin A. Dietary records. Fruit & vegetables.*

Correspondence: Begoña Olmedilla-Alonso.
Departamento de Metabolismo y Nutrición.
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).
Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
C/ Jose Antonio Novais, 10.
28040 Madrid, Spain.
E-mail: bolmedilla@ictan.csic.es

Recibido: 24-I-2013.
Aceptado: 16-III-2013.

APLICACIÓN INFORMÁTICA PARA EL CÁLCULO DE LA INGESTA DIETÉTICA INDIVIDUALIZADA DE CAROTENOIDES Y DE SU CONTRIBUCIÓN A LA INGESTA DE VITAMINA A

Resumen

Introducción: Las aplicaciones informáticas utilizadas para valorar la ingesta dietética suelen centrarse en macro y micronutrientes, pero no en otros componentes de la dieta con potenciales efectos beneficiosos sobre la salud, entre los que están los carotenoides. El grado en que cada carotenoide ejerce diversas actividades biológicas es diferente y por tanto, interesa utilizar datos de su composición en alimentos de forma individualizada.

Objetivo: Elaborar una aplicación informática con datos individualizados de carotenoides que permita el cálculo de su ingesta dietética y la consulta del contenido de estos compuestos en los alimentos.

Material y métodos: Aplicación informática desarrollada con Java 7, que incluye una base de datos de carotenoides (luteína, zeaxantina, licopeno, β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno) en alimentos (incluyendo aquellos que son principales contribuyentes a la ingesta de carotenoides en Europa), generados por HPLC. Se incluyen las variables relativas a los alimentos, sujetos y dietas, que son necesarias para una correcta información del contenido de carotenoides en alimentos y para el cálculo de su ingesta.

Resultados: La aplicación informática permite calcular la ingesta dietética individualizada de carotenoides, a partir de 128 alimentos (crudos y cocinados) y su contribución a la ingesta de vitamina A, en las dos formas utilizadas actualmente, equivalentes de retinol y equivalentes de actividad de retinol.

Conclusiones: Con esta aplicación informática se facilita la consulta de concentraciones de carotenoides en alimentos y el cálculo de su ingesta de forma ágil, específica y precisa, aspectos imprescindibles en los estudios de investigación sobre dieta y salud.

(Nutr Hosp. 2013;28:823-829)

DOI:10.3305/nh.2013.28.3.6451

Palabras clave: *Aplicación informática. Carotenoides. Vitamina A. Registros dietéticos. Frutas y hortalizas.*

Abreviaturas

EP: Edible Portion.

RE: Retinol equivalents.

RAE: Retinol activity equivalents.

HPLC: High performance liquid chromatography.

Introduction

The assessment of dietary intake is carried out by means of dietary data collection, using food intake records, for the purpose of obtaining manageable and interpretable data on the intake of macronutrients, micronutrients and other compounds that are potentially beneficial to health (e.g. carotenoids, polyphenols, etc.). This intake assessment is one of the mainstays, together with the recording of biochemical and anthropometric parameters, for the evaluation of the nutritional status, which is essential for the implementation and follow-up of health strategies on the individual basis or in public health.

The transformation of foods into nutrients is performed using food composition tables, classically completed by hand and, at the present time, employing spreadsheets developed by research teams for their own use or by means of software applications, some of which are commercially available.¹⁻³ These tables generally contain macronutrient and micronutrient composition data, but do not specify the carotenoids, despite the relevance of these substances in studies that have related diet to health for years, both for their provitamin A activity and for other biological activities such as antioxidant activity, potentiation of immune function, and their relationship to different diseases (lutein and improved visual function;⁴⁻⁶ lycopene and cardiovascular health).⁷⁻⁹ On the other hand, knowledge of the concentration of each carotenoid in foods is highly interesting since the degree to which they exert their biological activities differs from one carotenoid to another,^{10,11} and the manner in which they express their contribution to vitamin A intake can also be calculated in different ways. Thus, and on the basis of previous reports by our group concerning the carotenoid content of,¹²⁻¹⁴ and on carotenoid intake in the Spanish and European population,¹⁵ our aim was to develop a software application with individualized data on carotenoids that makes it possible to consult the content of these compounds in foods, as well as to calculate their dietary intake, in order to enable the performance of more reliable and accurate studies on diet and health.

Material and methods

The software application was developed with Java 7 (v. 7) using a database of carotenoid content in foods previously published by our group,¹⁶ which provides the levels of the carotenoids usually assessed in the

context of diet and health: lutein, zeaxanthin, lycopene, β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene. In addition to these carotenoids, the software application makes it possible to include data on the following: γ -carotene, α -cryptoxanthin, phytoene, phytofluene, violaxanthin, neoxanthin, neurosporene, capsanthin, capsorubin, antheraxanthin, lactucaxanthin, canthaxanthin, astaxanthin and echinenone. The foods included, nearly exclusively from the plant kingdom, are the major contributors to the intake of carotenoids in Europe.^{15,17,18}

In the software application, we introduced different types of variables relative to the foods, the subjects and their diets, all of which are necessary to provide accurate information on the content of carotenoids in foods and for the calculation of their intake (fig. 1). The description of the foods includes the common name, scientific name, color (reddish-orange, green, yellowish-white), whether it is of plant or animal origin, the food group to which it belongs according to the food composition tables of Moreiras et al.,¹⁹ the edible portion (EP), the literature reference, the concentration of each carotenoid and the contribution of carotenoids in foods to vitamin A intake.

The article presenting the database included in the software application does not provide information on the EP of the foods and, thus, this datum has been taken from original articles published by our group,¹²⁻¹⁴ and the foods for which data have been compiled were assigned the EP indicated in the food composition tables of Moreiras et al.¹⁹ The EP of the cooked foods is 100 because the nonedible portion is discarded prior to cooking.

The contribution of each food to vitamin A intake is expressed in the two forms currently used: retinol equivalents (RE) and retinol activity equivalents (RAE).^{19,20}

$$\text{RE } (\mu\text{ g/day}) = \text{retinol} + (\beta\text{-carotene}/6) + (\alpha\text{-carotene}/12) + (\beta\text{-cryptoxanthin}/12).$$

$$\text{RAE } (\mu\text{ g/day}) = \text{retinol} + (\beta\text{-carotene}/12) + (\alpha\text{-carotene}/24) + (\beta\text{-cryptoxanthin}/24).$$

Concerning the subjects and their diets, the variables considered for the software application are those of interest for the evaluation of nutritional status. With respect to the subjects, we consider the sex, age, body weight, height and body mass index. With regard to the diets, we take into account the day the record is made (the date and whether it is a holiday or a working day), the type of meal (breakfast, midmorning snack, midday meal, midafternoon snack, dinner and others), the food and the amount consumed (weight in grams), which can be established on the basis of the weights of the Spanish portions indicated in the literature.¹⁹

The reports generated by the application provide information on the intake of individual and total carotenoids, as well as the intake of those grouped as follows: the carotenes (β -carotene, α -carotene, γ -

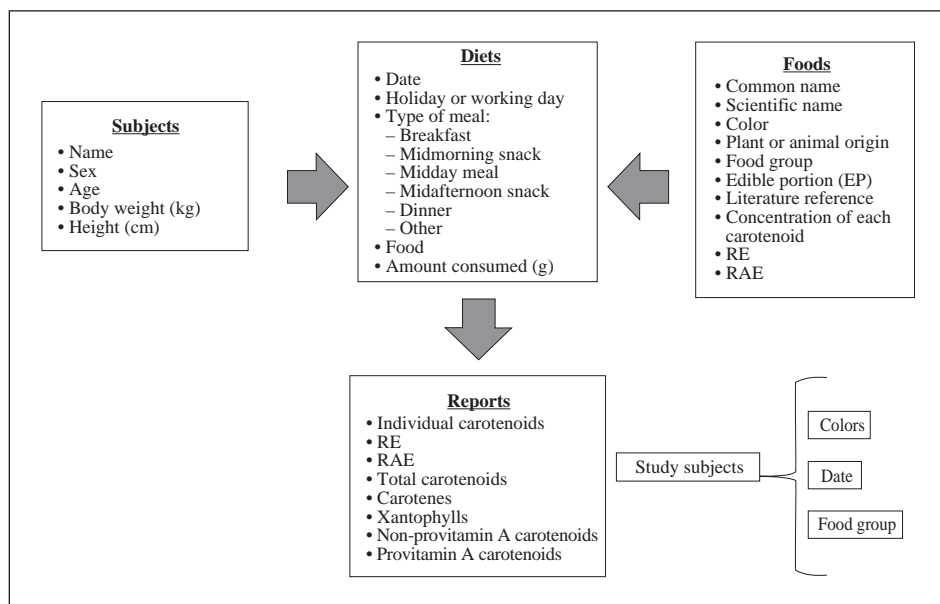


Fig. 1.—Software application diagram.

carotene, lycopene, phytoene, phytofluene and neurosporene), the xanthophylls (lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -cryptoxanthin, neoxanthin, violaxanthin, capsanthin, capsorubin, antheraxanthin, lactucaxanthin, canthaxanthin, astaxanthin and echinenone), the provitamin A carotenoids (β -carotene, α -carotene, γ -carotene, α -cryptoxanthin, β -cryptoxanthin and echinenone) and the non-provitamin A carotenoids (lutein, zeaxanthin, lycopene, phytoene, phytofluene, violaxanthin, neoxanthin, neurosporene, capsanthin, capsorubin, antheraxanthin, lactucaxanthin, canthaxanthin and astaxanthin).

Results

The application offers three screens with information relative to the foods, the subjects and the diets. In the food screen, we can consult the carotenoid content in the foods and incorporate data on new foods. In the other two screens, with data on the subjects and their diets, we can calculate the dietary carotenoid intake and its contribution to vitamin A intake, and issue reports with the results.

At the present time, the food screen (fig. 2) contains data on the concentrations of six carotenoids (lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, lycopene, α -carotene and β -carotene) and the vitamin A content, expressed in RE and RAE, of 128 foods that can be edited. This means that the database can be enlarged over time by adding both new foods and updated data on carotenoid concentrations.

The dietary carotenoid intake is calculated using the subject and diet screens (fig. 3). In the subject screen, the user enters the data relative to age, sex, body weight and height. The application permits the simultaneous enrollment of a subject in different studies, utilizing the

corresponding study code which, together with the code automatically assigned upon introduction of the subject's data (ID), enables his or her identification.

The diet records include the date of each record, indicating whether it is a holiday or a working day. For each day recorded, the foods are introduced taking into account the type of meal (presented as a dropdown menu) in which they have been consumed, defined as breakfast, midmorning snack, midday meal, midafternoon snack, dinner and others. In another dropdown menu, corresponding to foods, the user marks the food consumed and enters the amount in grams. When the food is ingested raw, the purchase weight is introduced and the application, using the EP, transforms it into the net amount consumed. In addition to the EP for raw items, the list of foods provides data on certain cooked foods and, for them, the weight indicated by the user should represent the amount consumed, as the EP is 100. The software application does not permit the entry of the same type of food twice on the same date and meal. Thus, if a food is present in more than one dish in a given meal, the total sum in grams has to be introduced.

The reports with the data on the diets of the subjects (identified by means of the study code and ID) are generated in Excel in the "report" file once a study is selected from the dropdown menu of the main screen. This generates three reports on carotenoid intake: foods consumed according to their color; the food groups; and the dates of consumption (fig. 4).

The report of carotenoid intake according to "colors" has a tab for each of the colors under which the foods consumed on the recorded days are grouped. Each tab opens to the user data on the mean intake of individual and total carotenoids provided by each group of foods, identified by their color, and of these carotenoids divided into the groups of carotenes, xanthophylls, non-provitamin A carotenoids and

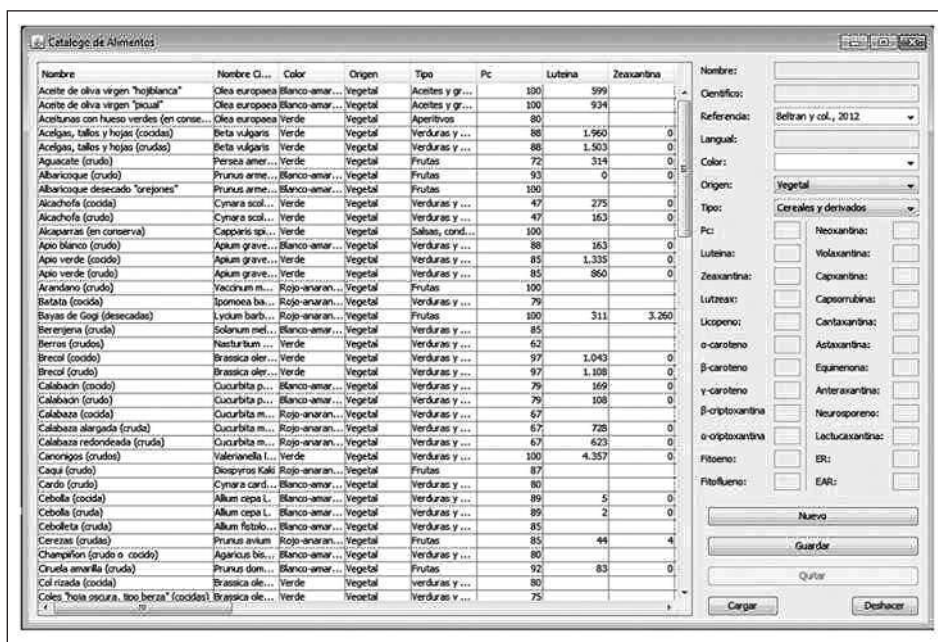


Fig. 2.—Food screen.

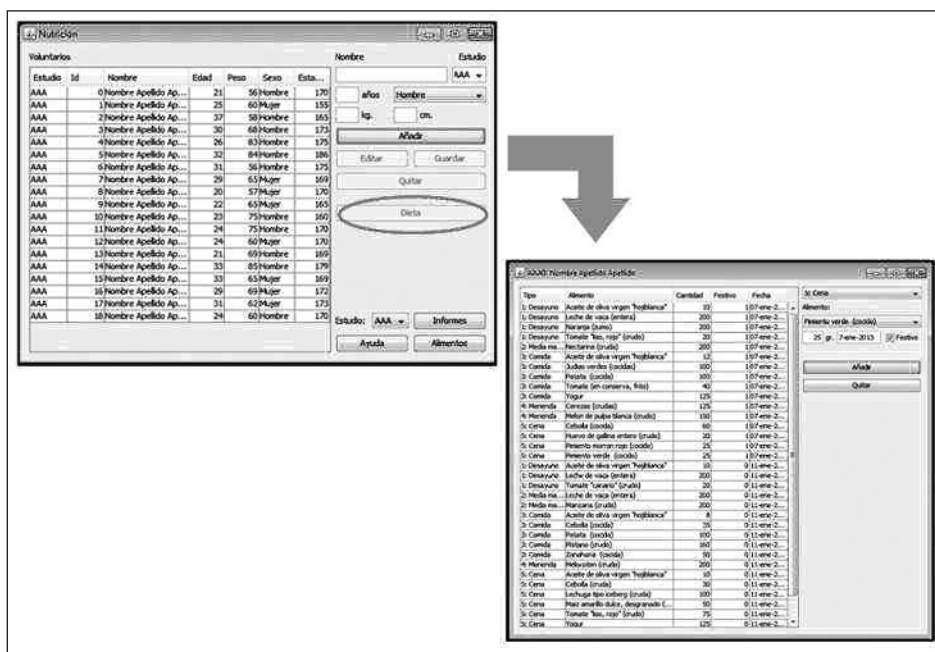


Fig. 3.—Subject screen and diet records screen.

provitamin A carotenoids, as well as their contribution to vitamin A intake expressed in RE and RAE. This structure is also employed in the report corresponding to the food groups.

The date report presents two types of tabs: a first set designated by the word “day” and a number that corresponds to the chronological order according to the date of the record. A “day” tab is generated for every day recorded. Each tab opens to the intake, for each type of meal, of individual and total carotenoids, and of these carotenoids divided into the groups of carotenes, xanthophylls, non-provitamin A carotenoids and provitamin A carotenoids, as well as their contribution

to vitamin A intake expressed in RE and RAE, on that record date. The last tab will always be that labeled “Mean of Dates”, and shows the mean intake of each volunteer corresponding to the above mentioned variables, based on the data obtained from all the days entered.

Discussion

The software applications employed to assess dietary intake usually focus on the macro- and micronutrients (vitamins and minerals), but not on

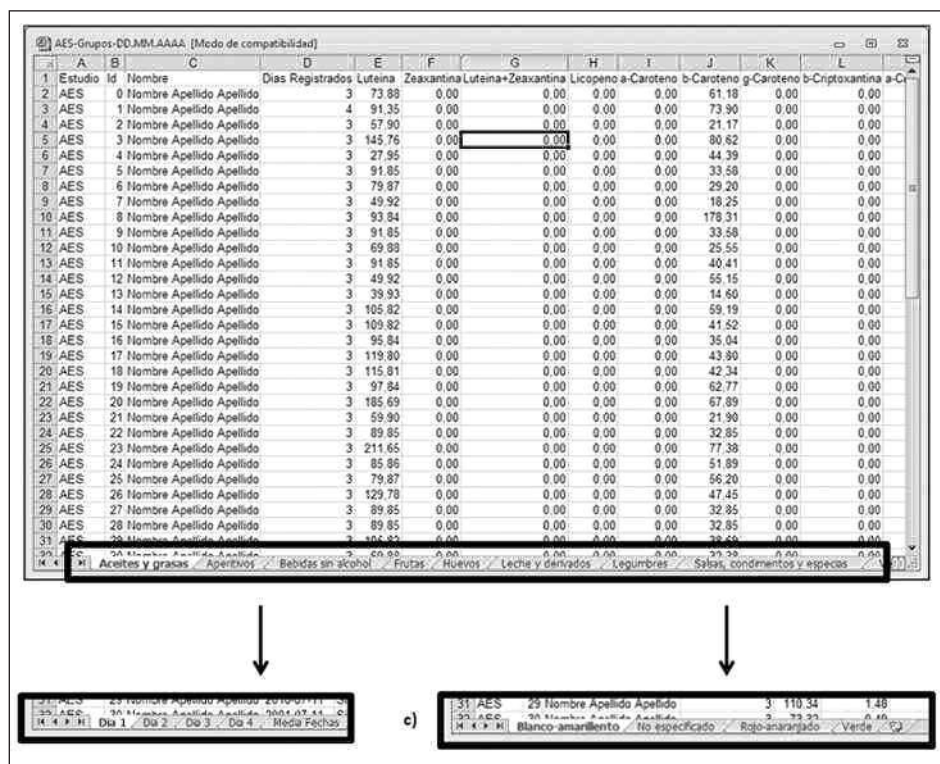


Fig. 4.—Reports generated by the application: a) Food groups report; b) Date report; c) Colors report.

other components of the diet with potential beneficial effects on health. These compounds are dealt with little or not at all in the food composition tables (e.g. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), 2012) (FAO; LATINFOODS, 2009)^{21,22} that are sources of data for these applications. Of the tables that include information on carotenoids, very few provide it on an individual basis.^{23,24} They generally show data only on the content in β -carotene²⁵, on the three carotenoids with provitamin A activity expressed jointly¹⁹ or on the vitamin A content expressed as RE^{19,22,26} or as RAE.^{21,23}

To our knowledge, there is only one software application for the calculation of dietary intake that provides data on carotenoids,² using data generated by our group,¹² which we have also used for our application. Moreover, we have included additional data, some from our own analyses, while others were compiled on the basis of well-defined criteria.¹⁶ The foods included are consumed both in Spain^{17,18} and in other European countries.¹⁵ The data on carotenoids included in the application were obtained by high performance liquid chromatography (HPLC), the majority in analyses performed by our group¹²⁻¹⁴ using an analytical procedure that is considered to be highly acceptable.²⁴ For nearly all the foods included in our application, data on lutein and zeaxanthin are provided separately, an approach that is still uncommon in the literature.

The carotenoids for which the software application offers the greatest body of data are those that are found in the largest amounts in human blood and, thus, have been widely studied in the context of diet and health: β -carotene, α -carotene and β -cryptoxanthin (all three

with provitamin A activity) and lutein, zeaxanthin and lycopene (without provitamin A activity). However, in the diet, we usually consume more than 40 and, although they do not reach the blood in appreciable amounts, they may have relevant biological activity in other tissues, for example, in the intestines (e.g. neoxanthin, violaxanthin, γ -carotene, phytoene and phytofluene).²⁷ Thus, these carotenoids have been included in the software application, together with others present in plants widely consumed by the Spanish population (e.g. capsanthin and capsorubin in peppers, lactucaxanthin in lettuce and cucurbitaxanthin in edible gourds), which could be of interest in the future in different branches of research such as health care or ecosystems.

The fact that this software application has a screen with food data constitutes an advantage with respect to other applications used in nutritional evaluation, as it makes it possible to continue to update the information. On the other hand, although there are food composition databases on the web that are updated periodically,^{23,25} we have found no applications that incorporate them for the purpose of assessing nutritional status. The consultation of this screen can be useful in different settings such the clinical, agronomic and research sectors. In the clinical setting, it is of interest both for drafting dietary recommendations that make it possible to reach certain levels of vitamin A intake in the general population and for designing personalized diets. It is also a tool for calculating the contribution of each food to vitamin A intake based on the individual content of each carotenoid, either by means of the usual expressions currently in use (RE or RAE), or by any

future expression. Both in the clinical setting and in the research field, it is interesting for us to know specific facts on certain carotenoids that are associated with a reduction of the risk of different diseases, such as lutein and zeaxanthin relative to the risk of age-related macular degeneration⁴⁻⁶ or lycopene relative to a lower risk of cardiovascular disease,⁷⁻⁹ which can be of interest for specific subjects or for the performance of intervention studies. Finally, in the agronomic setting, the identification of varieties with a higher content in carotenoids with provitamin A activity or in other carotenoids may be of interest to promote their cultivation or their utilization in the food and agricultural industry.²⁸ For all these reasons, our aim is to make our software application on carotenoids available on the internet in the near future for the purpose of extending the scope of this work.

The majority of the foods included are vegetables and fruits since they are the major contributors to carotenoid intake. However, others, like dairy products, olive oil and eggs, have been included because, depending on the amounts consumed, they can influence total carotenoid intake. For each food, the common name and scientific name are provided to facilitate their identification, as is the color, since it is usually associated with a given carotenoid profile in the food and is the aspect referred to in dietary recommendations.²⁹

For the proper assessment of the carotenoid status of the subjects, we introduced into the application those variables for which differences in their intake or serum concentration have been reported, such as sex and age,^{30,31} and others such as body weight and height for the purpose of the classification, and study, of the individuals according to their weight status (normal, overweight and obese), which also influences, in some cases, the serum levels of certain carotenoids, as is the case of lutein.³² With respect to the diet, since it can be recorded by means of different types of dietary surveys, such as 24-hour recalls, 3-day or 7-day diet diaries, etc., or even surveys repeated over time,¹⁹ the software application is flexible in terms of the number of days reported. It also makes it possible to differentiate between holidays and working days, a datum to be taken into account in order to obtain a true representation of the overall diet of the subject, as meals usually differ depending on the routine of a given day.^{33,34}

With respect to the amounts consumed, the software application allows them to be entered in grams, a circumstance that increases the flexibility for use with different dietary surveys, such as those that record the weights of the foods consumed. It also permits greater accuracy, as it does not consider portions of the same size for every type of sample population.

Finally, the fact that the application differentiates the type of meal (breakfast, midmorning snack, midday meal, midafternoon snack, dinner and others) in which a food has been consumed enables us to obtain an idea of the eating habits of the study population, an aspect that is highly useful for evaluations in the clinical or

public health setting because it allows us to issue recommendations in accordance with the established habits of a given individual or population.

The calculations of dietary intake are generated in different reports for a given study, according to the characteristics of the food (color or group) and the customary diet of the individual (dates), and all of them provide the data on individual and total carotenoid intake, as well as the intake of those having provitamin A activity, those without provitamin A activity, the carotenes and the xanthophylls. The data is presented in Excel format, which is compatible with most statistical software packages, for the subsequent analysis of the results. The assessment of dietary intake of carotenoids grouped as carotenes and as xanthophylls may be of interest since the chemical structure determines the physicochemical properties (e.g. polarity, solubility) of these compounds and, thus, their greater or lesser accessibility to different tissues and the degree to which they exert certain biological activities.³⁵

This software application for our carotenoid database facilitates the consultation of the carotenoid concentrations in foods consumed by the Spanish population, as well as the management of data of each subject and the calculation of their intake of individual carotenoids in a dynamic, specific and accurate way. All of these aspects are essential in studies on diet and health, both relative to the provitamin A activity exhibited by some of them and with respect to other biological activities exerted to a greater or lesser degree by all the carotenoids, and that have potential beneficial effects on human health.

Acknowledgments

The authors appreciate the funding received from Acción Estratégica en Salud of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica, Spain) (grant no. PS09/00681). They also wish to thank Luis Canet Salazar for enabling the implementation of the software application on the basis of our work method, and Martha Messman for the preparation of the manuscript.

Rocío Estévez Santiago is a recipient of a JAE-Predoc grant from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), awarded under the program of the Junta para la Ampliación de Estudios, co-financed by the European Social Fund (ESF).

R. Estévez-Santiago and B. Olmedilla-Alonso are members of the IBERCAROT network, financed by the Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) program (grant no. P111RT0247).

References

1. Gutiérrez-Bedmar M, Gómez-Aracena J, Mariscal A, García-Rodríguez A, Gómez-Gracia E, Carnero-Varo M, Fernández-Crehuet Navajas J. Nutrisol: un programa informático para la

- evaluación nutricional comunitaria y hospitalaria de acceso libre. *Nutr Hosp* 2008; 23 (1): 20-6.
2. Pérez-Llamas F, Garaulet M, Herrero F, Palma J, Pérez de Heredia F, Marín R, Zamora S. Una aplicación informática multivalente para estudios del estado nutricional de grupos de población. Valoración de la ingesta alimentaria. *Nutr Hosp* 2004; 19 (3): 160-6.
 3. Salvador G, Palma I, Puchal A, Vilà M, Miserachs M, Illan M. Entrevista dietética. Herramientas útiles para la recogida de datos. *Rev Med Univ Navarra* 2006; 50 (4): 46-55.
 4. Lien E, Hammond B. Nutritional influences on visual development and function. *Prog Retin Eye Res* 2011; 30: 188-203.
 5. SanGiovanni J, Neuringer M. The putative role of lutein and zeaxanthin as protective agents against age-related macular degeneration: promise of molecular genetics for guiding mechanistic and translational research in the field. *Am J Clin Nutr* 2012; 96 (Suppl.): 1223S-33S.
 6. Stringham J, Bovier E, Wong J, Hammond Jr B. The Influence of Dietary Lutein and Zeaxanthin on Visual Performance. *J Food Sci* 2010; 75 (1): R23-R29.
 7. Böhm V. Lycopene and heart health. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 296-303.
 8. Palozza P, Parrone N, Simone R, Catalano A. Lycopene in atherosclerosis prevention: An integrated scheme of the potential mechanisms of action from cell culture studies. *Arch Biochem Biophys* 2010; 504: 26-33.
 9. Ried K, Fakler P. Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials. *Maturitas* 2011; 68: 299-310.
 10. Burri B, Chang J, Neidlinger T. β -Cryptoxanthin- and α -carotene-rich foods have greater apparent bioavailability than β -carotene-rich foods in Western diets. *Brit J Nutr* 2011; 105: 212-9.
 11. Benedich A. From 1989 to 2001: What Have We Learned About the "Biological Actions of Beta-Carotene"? *J Nutr* 2004; 134: 225S-230S.
 12. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 2135-40.
 13. Olmedilla B, Granado F, Rojas-Hidalgo E. Quantitation of provitamin and non provitamin A carotenoids in fruits most frequently consumed in Spain. En: Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects, 1993; K Waldrom, I Johnson y Fenwic GK, pp. 141-5.
 14. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Gil-Martínez E. Carotenoid content in fruit and vegetables and its relevance to human health: Some of the factors involved. *Recent Res Devel in Agricultural & Food Chem* 1998; 2 (1): 57-70.
 15. O'Neill M, Carroll Y, Corridan B, Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Thurnam DI. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Brit J Nutr* 2001; 85: 499-507.
 16. Beltrán B, Estévez R, Cuadrado C, Jiménez S, Olmedilla Alonso B. Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutr Hosp* 2012; 27 (4): 1334-43.
 17. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50 (4): 246-50.
 18. Granado F, Blázquez S, Olmedilla B. Changes in carotenoid intake from fruit and vegetables in Spanish population over the period 1964-2004. *Public Health Nutr* 2007; 10 (10): 1018-23.
 19. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de Composición de Alimentos. 2011; 15^o edition. Ediciones Pirámide. Madrid.
 20. Institute of Medicine. Dietary References Intakes for Vitamin A Vitamin K Arsenic Boron Chromium Copper Iodine Iron Manganese Molybdenum Nickel Silicon Vanadium and Zinc. 2000; National Academic Press. Washington DC.
 21. Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica. [Base de datos en internet] Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). [Consultado en diciembre de 2012] http://www.incap.org.gt/index.php/es/acerca-de-incap/cuerpos-directivos2/consejo-directivo/doc_download/80-tabla-de-composicion-de-alimentos-de-centroamerica
 22. Tabla de Composición de Alimentos de América Latina. [Base de datos en internet] FAO/ LATINFOODS. [Consultado en diciembre de 2012] <http://www.rlc.fao.org/es/conozca-fao/que-hace-fao/estadisticas/composicion-alimentos>
 23. USDA-NCC Carotenoid database for U.S. Foods. 1998. [Base de datos en internet] Agricultural research service, U.S. Department of Agriculture. [Consultado en diciembre de 2012] <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list>
 24. West C y Poortvliet E. The carotenoid content of foods with special reference to developing countries. 1993; VITAL, International Science and Technology Institute. Arlington, Virginia.
 25. Table Ciquial 2012. French Food Composition Table. [Base de datos en internet] French Agency for food environmental and occupational health & safety. [Consultado en diciembre de 2012] <http://www.afssa.fr/TableCIQUAL/>
 26. Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA). [Base de datos en internet] RedBedca y AESAN. [Consultado en diciembre de 2012] <http://www.bedca.net>
 27. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? *Free Radical Res* 2000; 33: 809-30.
 28. FAO Nutrición y biodiversidad. [En línea] Consultado en enero de 2013 <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0112s/i0112s08.pdf>
 29. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund. Food Nutrition Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. 2007. Washington (USA).
 30. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Seasonal and sex related variations in serum levels of six carotenoids retinol and a tocopherol. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 106-10.
 31. Granado F, Olmedilla B, Gil-Martínez E, Blanco I, Millán I, Rojas-Hidalgo E. Carotenoids retinol and tocopherols in insulin dependent diabetics and their immediate relatives. *Clin Sci* 1998; 94 (2): 189-95.
 32. Kirby M, Beatty S, Stack J, Harrison M, Greene I, McBrinn S, Nolan J. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of lutein and zeaxanthin in response to weight loss. *Brit J Nutr* 2011; 105: 1036-46.
 33. Haines P, Hama M, Guilkey D, Popkin M. Weekend eating in the United States is linked with greater energy fat and alcohol intake. *Obes Res* 2003; 11 (8): 945-9.
 34. Rothausen B, Matthiessen J, Hoppe C, Brockhoff P, Andersen L, Tetens. Differences in Danish children's diet quality on weekdays v weekend days. *Pub Health Nutr* 2012; 15 (9): 1653-60.
 35. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb J* 1995; 9 (15): 1551-8.

RESEARCH

Open Access

Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women: dietary intake, serum concentrations, lipid profile and macular pigment optical density

Begoña Olmedilla-Alonso^{1*}, Beatriz Beltrán-de-Miguel², Rocío Estévez-Santiago¹ and Carmen Cuadrado-Vives²

Abstract

Background & aims: Lutein and zeaxanthin accumulate in retina (macular pigment). Their nutritional status can be assessed using dietary or biochemical markers and both have been associated with macular pigment optical density. We proposed to assess dietary and status markers of lutein and zeaxanthin in a group of healthy Spanish volunteers, considering the potential influence of age, gender and serum lipids to investigate the predictors of the macular pigment optical density.

Methods: Serum lutein and zeaxanthin concentrations, dietary intake and macular pigment optical density were determined in 108 healthy men and women (20–35 and 45–65 years), using high-performance liquid chromatography, 3-day food records and heterochromic flicker photometry, respectively. Mann–Whitney U-test, Spearman correlation coefficient and multivariate regression analysis were used for the statistical study.

Results: Serum concentrations and dietary intake of lutein plus zeaxanthin ($p < 0.0001$ and $p = 0.001$, respectively) were higher in older vs younger subjects, whereas macular pigment optical density was lower ($p = 0.038$). The highest correlation coefficients between intake and serum were for fruit and serum lutein ($p = 0.452$, $p < 0.0001$) and for fruit and lutein + zeaxanthin ($p = 0.431$, $p < 0.0001$) in the younger group. Macular pigment optical density correlated with serum xanthophylls ($p = 0.223$, $p = 0.02$) and fruit and vegetable intake ($p = 0.350$, $p = 0.0002$), showing highest correlations when lutein and zeaxanthin were expressed in relation to serum lipids in older subjects ($p = 0.262$, $p = 0.006$). Multivariate regression analysis identified age and serum lutein as major predictors of macular pigment optical density (total sample), and a coefficient of determination of 29.7% for the model including lutein + zeaxanthin/cholesterol + triglycerides, sex and fruit + vegetables in the older group.

Conclusions: The establishment of normal/reference ranges for serum lutein and zeaxanthin should consider age ranges and be expressed in relation to lipid concentrations, at least in subjects over 45 years, as this could influence macular pigment optical density. The macular pigment optical density showed age-specific correlations with lutein plus zeaxanthin expressed in relation to serum lipid concentrations as well as with the fruit and vegetable intake.

Keywords: Lutein, Zeaxanthin, Serum, Dietary intake, Macular pigment optical density, Lipid profile

* Correspondence: BOlmedilla@ictan.csic.es

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), C/José Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Introduction

Lutein and zeaxanthin are plant pigments that belong to the well-known group of carotenoids, subgroup of xanthophylls (oxycarotenoids), found in the human body (blood, tissues, and concentrated in retina, where they constitute what it is known as the macular pigment [MP]). They are provided only in the diet, and are transported in blood to the different tissues by lipoproteins [1]. Both xanthophylls, but primarily lutein, have been investigated in relation to eye health and disease. They act by filtering blue-light and as antioxidants that may protect macular pigment from oxidative damage induced by light and the high rate of oxidative metabolism in the eye. Moreover, there is increasing evidence suggesting that MP may protect against age-related maculopathy [2].

Traditionally, exposure to or nutritional status assessment of lutein (generally assessed together with zeaxanthin) in human subjects has routinely been performed using dietary or biochemical methods [2-5]. The dietary intake of lutein and its presence in blood / tissues (i.e. in retina) have been associated with a lower risk for age-related diseases, and the levels increase upon the ingestion of lutein-rich foods and lutein supplements [3,6,7]. Determination of serum lutein and zeaxanthin concentrations has been considered the best available method for establishing their nutritional status in human subjects [2,4,5], and these concentrations are affected by dietary and host-related factors that influence their absorption and utilization [3,7]. The lutein concentration in serum is considered to reflect short-term dietary intake and, although it often correlates poorly with said intake, it is widely accepted as a good biomarker of fruit and vegetable intake [3].

The MP density can be considered a marker of long-term dietary exposure [4,8] that can be measured by a number of techniques and the most widely used noninvasive test is heterochromatic flicker photometry [9]. Its assessment is increasingly being performed due to new commercially available devices that can easily be employed in clinical practice. To know to what extent macular pigment optical density (MPOD) can be considered a surrogate measure of lutein and zeaxanthin intake and status, we need more data from well-defined, homogeneous populations, with information on the many factors affecting the levels of these compounds. This would shed light on their role in visual function and in the reduction of risk of eye diseases, and allow comparisons between population groups. Dietary and serum lutein and zeaxanthin concentrations have often been positively associated with MP [5,7,8], but conflicting results have been reported concerning the influence of several variables (sex [2,9], age [2], body mass index (BMI) [10] and lipids [11]), among other factors.

This study was designed to assess: 1) dietary and status markers (diet, serum and MPOD) of lutein and zeaxanthin,

together with serum lipid profile as a confounding factor and, 2) the predictive value of those compounds and several confounding factors (age, sex, serum lipids) for the MPOD, in a population of well-characterized healthy Spanish volunteers, grouped according to age and gender, as these factors can modify the lutein and zeaxanthin concentrations in the three status markers or the correlations among them.

Materials and methods

Subjects and study design

108 volunteers (54 men and 54 women), divided into two age groups (20 to 35 y and 45 to 65 y) (mean \pm SD: 25.6 ± 3.2 y and 52.4 ± 5.2 y, respectively) were enrolled in a cross-sectional study. These age groups were established because of their different dietary habits and risk of age-related ocular disease. Participants were selected from those subjects who were interested and contacted through advertisements in different universities, research centers, and several noticeboards (i.e. intranet of several Spanish ministries). Of the 137 individuals who showed their interest in participating in the study, 5 were excluded because of a high cholesterol level, 4 because they were taking omega-3 food supplements or enriched milk, 2 because of his/her BMI and 19 because their age and sex corresponded to a group in which the established number of subjects had been reached. The inclusion criteria were normal cholesterolemia, BMI under 30 kg/m^2 , mixed diet (no avoidance of any food groups). Volunteers were asked to report information on the following exclusion criteria: consumption of dietary supplements, BMI under 20 kg/m^2 , surgery for myopia (within the previous year), cataracts or macular degeneration, use of drugs or phytosterol-enriched beverages/foods to control cholesterol level, regular consumption of n-3 fatty acid-enriched food products and chronic diseases that can affect carotenoid or lipid metabolism (i.e. diabetes, cardiovascular disease).

The volunteers included in this cross-sectional study underwent blood sampling, assessment of the MPOD and 3-day food records. The subjects were enrolled over the course of an entire year (during the spring and summer: 40 in the younger and 29 in the older age group, and, during the fall and winter: 14 in the younger and 25 in the older age group). Blood samples were collected after overnight fast (at least 8 hours) and serum obtained for the analysis of lutein, zeaxanthin and lipid profile.

This study was conducted in accordance with the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda of Madrid, Spain (registry no. 257, dated 19 July 2010). Written informed consent was obtained from all subjects.

Lutein, zeaxanthin and lipid analysis in blood

Lutein and zeaxanthin levels were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using a system consisting of a model 600 pump, a Rheodyne injector and a 2998 photodiode array (PDA) detector (Waters, Milford, MA, USA) in accordance with standard procedures described elsewhere [12]. We used a Spheri-5 ODS 5 μm (220 mm \times 4.6 mm) chromatographic column (Brownlee Labs, Applied Biosystem, Santa Clara, CA, USA) with a guard column (Aquapore ODS type RP-18). The mobile phase was acetonitrile-methanol (85:15; v/v), and was changed to acetonitrile-dichloromethane-methanol (70:20:10; v/v/v) in a linear gradient from min 5 to min 20. Both mobile phases were stabilized with ammonium acetate (0.025 mol L⁻¹) added to the methanol. The flow rate was 1.8 mL min⁻¹, and detection was performed at a wavelength of 450 nm. All chromatograms were processed using Empower 2 software (Waters, Milford, MA, USA).

Carotenoid extraction was performed on serum samples using a slight modification of a previously published method [12]. Briefly, 200 μL of serum was added to 200 μL of ethanol, vortexed and extracted twice with 400 μL of hexane: dichloromethane (5:1) stabilized with 0.1 g/L butylated hydroxytoluene. Organic phases were pooled, evaporated to dryness under nitrogen atmosphere and reconstituted with 200 μL of a solution of tetrahydrofuran: ethanol (1:2) and injected (5 μL) onto the HPLC system.

Methanol, ethanol, acetonitrile, dichloromethane, ammonium acetate, butylated hydroxytoluene (BHT) and tetrahydrofuran were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Lutein (xanthophyll from marigold) was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and zeaxanthin was purchased from Fluka Analytica (Sigma Aldrich).

Standard solutions were prepared from 1 mg of lutein and of zeaxanthin dissolved in 25 mL tetrahydrofuran, with 0.01% BHT in each case. The $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ values and wavelengths used were as follows: lutein, 2550 at 445 nm; zeaxanthin, 2540 at 450 nm. Working solutions were obtained from different volumes of the standard solutions dissolved in tetrahydrofuran: ethanol (1:2 v/v). The concentrations of the carotenoids in the curve were: 0.27-1.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for lutein ($R^2 = 0.999$) and 0.03-0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for zeaxanthin ($R^2 = 0.999$).

Blood total cholesterol and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol were analyzed by colorimetric enzyme assay (Cobas Integra 400 plus, Roche). The low-density lipoprotein (LDL) cholesterol level was calculated with the Friedewald *al* equation [13]. Serum triglycerides were determined using an enzymatic colorimetric test (Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany), a method that employs lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase.

Dietary intake assessment

Recent dietary intake was evaluated using 3-day food records involving 24 h recalls, one of which coincided with a weekend or holiday, carried out within a period of 7 to 10 days. For the first recall, the participants underwent a face-to-face encounter with a specialized interviewer, normally the same person who, subsequently, performed the other two recalls by telephone. The amounts consumed were estimated in units (fruits), portions or household servings standardized for this study [14]. On the basis of this information, we calculated food intake in grams/day, which served as the basis for the determination of the daily lutein and zeaxanthin intake using a database designed by our group, included in a software application for the calculation of dietary intake of individual carotenoids [15]. To evaluate the lipid and energy intake, we employed a food composition table widely used in Spain [14].

Macular pigment optical density (MPOD) assessment

Macular pigment optical density was assessed using an MPS 9000 desktop device (Macular Pigment Screener, Elektron PLC, Cambridge, UK) that applies the principles of heterochromatic flicker photometry. The technique and reliability of this device are described in detail by van der Veen et al. [16]. The test consists of two stages for central and peripheral viewing, and the subjects were required to press a response button as soon as they detect flicker. The subjects started by fixating the central stimulus, a 1-degree central target (flicker rate is initially set to 60 Hz and then gradually reduced at a rate of 6 Hz s⁻¹). The process was repeated for a series of green-blue luminance ratios. The observer then fixated a red 2°-diameter target placed 8° eccentrically and a second set of data were recorded for peripheral viewing [17]. The MPOD is measured in density units (du) and ranges from 0 to 1.

Statistics

Sample size calculation was performed on the basis of a mean value for MPOD of 0.40 du. A sample of 108 subjects (SD = 0.10) was found to be necessary to obtain a 10% difference in the MPOD (0.04 du) with 85% power and an alpha error of 0.05. Data are expressed as the mean and standard deviation, median and 95% confidence interval. The normal distribution of the data was assessed (Kolmogorov-Smirnov test) and, as lutein and zeaxanthin in serum and diet and serum triglycerides did not follow a normal distribution, the Mann-Whitney U test was used to compare concentrations of the variables analyzed in the two groups (established according to sex and age). Age and sex were introduced as covariates in the generalized linear model and only age affected the concentration/intake of several variables. No interactions were observed for any of the variables except for serum lutein + zeaxanthin/HDL

serum which was affected by age and by sex and, HDL-cholesterol which was influenced by sex.

Correlations among variables in serum, diet and the MPOD were established using Spearman's rho correlation coefficient. All reported *P*-values are based on a two-sided test and compared to a significance level of 5%.

Multiple linear regression analysis was carried out using backward elimination as a model selection procedure, with macular pigment optical density as dependent variable and the following independent variables: sex, age, lutein and zeaxanthin in serum and in diet, lutein + zeaxanthin in serum and in diet, lutein + zeaxanthin/cholesterol + triglycerides, lutein + zeaxanthin/HDL-cholesterol, lutein + zeaxanthin/LDL-cholesterol and fruit and vegetable consumption. SPSS v.20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software was used for all statistical calculations.

Results

Table 1 shows the concentration of lutein and zeaxanthin in diet and serum, serum lipids, energy intake, MPOD and BMI of the sample as a whole and grouped according to age and sex, expressed as the mean and standard deviation, median and confidence interval. While there were no differences in lutein and zeaxanthin in serum and diet when the sexes were compared, we did observe differences between the two age groups, with higher concentrations in the older subjects than in the younger subjects. The lutein concentration was higher than the zeaxanthin concentration in both dietary intake (10.8-fold) and serum (4.6-fold) in the total sample (median values).

The difference in lutein and zeaxanthin between the two age groups disappeared when their concentrations were expressed in relation to serum lipids (cholesterol + triglycerides), but was maintained when intake was expressed in terms of dietary energy density (lutein plus zeaxanthin/1000 kcal). Regarding lipids in serum (all the subjects had serum cholesterol levels within normal range), the total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations showed age-related differences (higher in older *vs* younger subjects), whereas HDL-cholesterol and triglyceride concentrations showed sex-related differences (the former higher in women than in men and the latter vice versa). The mean BMI in the total sample was within normal range (23.4 ± 2.7 kg/m²), being higher in men *vs* women and in older *vs* younger subjects ($p = 0.002$). Finally, there were differences in the MPOD related to age (lower in older *vs* younger individuals, $p = 0.038$) but not to sex.

The dietary intake of the major sources of lutein and zeaxanthin (fruit, vegetables and eggs) is shown in Table 2. Energy intake was significantly greater in men than in women ($p < 0.001$), but this was not the case with the intake of food sources of lutein and zeaxanthin, which only show age-related differences (with the exception of egg

consumption), as they were consumed in greater amounts in the older group.

Correlations between diet and serum concentrations of lutein and zeaxanthin and their major food sources

The concentrations of lutein and zeaxanthin in diet, as well as the amounts of fruit and vegetables consumed, correlated significantly with the concentrations of lutein and zeaxanthin in serum in the total sample (Table 3). On comparing the age groups, those correlations were observed in the younger group but not in the older group (except for zeaxanthin and fruit and vegetable consumption). The intake of lutein and zeaxanthin, expressed as concentration per 1000 kcal, correlated significantly with their concentrations in serum in the total sample, a finding that was due to their correlations in the younger subjects. The highest correlation coefficients were for the correlations between fruit intake and lutein and lutein plus zeaxanthin concentrations in serum ($\rho = 0.452$, $p < 0.0001$ and $\rho = 0.431$, $p < 0.0001$, respectively) in the younger group.

Egg consumption, a good source of lutein, is lower than the Spanish mean intake (32 g/day) [18], showed a wide variability and had a significant inverse correlation with the serum lutein and zeaxanthin concentrations in the older group. The degree of correlation loses statistical significance if only those individuals who consumed eggs are assessed.

Correlations of lutein and zeaxanthin in diet and serum and the major sources of their dietary intake with macular pigment optical density

As shown in Table 4, the MPOD did not correlate significantly with serum lutein or zeaxanthin in the total sample, but showed significant correlations when they were expressed in relation to cholesterol plus triglycerides ($\rho = 0.170$, $p = 0.012$) and to serum LDL cholesterol concentrations ($\rho = 0.162$, $p = 0.017$). However, in the older group, in addition to the aforementioned relationships, we observed correlations with lutein, zeaxanthin ($\rho = 0.223$, $p = 0.02$) and with lutein plus zeaxanthin when expressed in relation to HDL-cholesterol ($\rho = 0.272$, $p = 0.004$) and LDL-cholesterol ($\rho = 0.301$, $p = 0.002$). There were no such significant correlations in the younger group.

With respect to the relationship between MPOD and the dietary intake of lutein and zeaxanthin, there were no correlations except for that of zeaxanthin in the older subjects and an inverse correlation with the lutein density in the total sample and in the younger group. However, there were significant correlations between fruit and vegetable intake and the MPOD in the older subjects, showing the highest coefficient correlations for the intake of fruit plus vegetables ($\rho = 0.350$, $p = 0.0002$), as well as in the total

Table 1 Dietary intake and serum concentrations of lutein and zeaxanthin, macular pigment optical density, serum lipids and body mass index in Spanish subjects (n=108) expressed as mean \pm standard deviation, (median) and confidence interval [95% CI]

	Men (n = 54)	Women (n = 54)	Aged 20–35 years (n = 54)	Aged 45–65 years (n = 54)	Total sample (n = 108)
Concentrations in serum					
Lutein ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	13.0 \pm 6.9 (11.2) [11.1; 14.8]	12.7 \pm 5.5 (11.7) [11.2; 14.2]	10.9 \pm 5.0 ^b (10.0) [9.5; 12.3]	14.8 \pm 6.6 ^b (13.0) [13.0; 16.6]	12.8 \pm 6.2 (11.6) [11.7; 14.0]
Zeaxanthin ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	2.9 \pm 1.4 (2.6) [2.5; 3.2]	2.8 \pm 1.3 (2.5) [2.5 ; 3.2]	2.7 \pm 1.2 (2.4) [2.4; 3.0]	3.0 \pm 1.5 (2.6) [2.6; 3.4]	2.8 \pm 1.4 (2.6) [2.6; 3.1]
Lutein + zeaxanthin ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	16.5 \pm 8.1 (14.6) [14.3; 18.8]	15.6 \pm 6.6 (14.1) [13.8; 17.5]	14.3 \pm 6.5 ^b (12.8) [12.5; 16.1]	17.9 \pm 7.8 ^b (15.7) [15.7; 20.0]	16.1 \pm 7.4 (14.4) [14.7; 17.5]
Lutein + zeaxanthin/cholesterol + triglycerides ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.06 \pm 0.03 (0.05) [0.05; 0.06]	0.06 \pm 0.03 (0.06) [0.06; 0.07]	0.06 \pm 0.03 (0.05) [0.05; 0.07]	0.06 \pm 0.03 (0.05) [0.05; 0.07]	0.06 \pm 0.03 (0.05) [0.06; 0.07]
Cholesterol (mg/dl)	186.0 \pm 42.9 (178) [174.3; 195.7]	187.1 \pm 42.9 (191) [172.7; 201.6]	165.4 \pm 43.2 ^b (163.5) [153.6; 177.2]	207.7 \pm 43.1 ^b (201.0) [196.0; 219.5]	186.6 \pm 48.0 (188) [177.4; 195.7]
HDL cholesterol (mg/dl)	52.5 \pm 14.1 ^a (51.5) [48.7; 56.4]	62.4 \pm 12.8 ^a (65.5) [58.9; 65.9]	55.6 \pm 12.9 (54) [52.1; 59.1]	59.4 \pm 15.5 (60.0) [55.1; 63.6]	57.5 \pm 14.3 (56) [54.8; 60.2]
LDL cholesterol (mg/dl)	110.7 \pm 37.2 (107) [100.6; 120.9]	109.7 \pm 43.6 (112.5) [97.8; 121.5]	92.8 \pm 35.3 ^b (88) [83.1; 102.4]	127.6 \pm 37.7 ^b (121.5) [117.3; 137.9]	110.2 \pm 40.3 (108) [102.5; 117.9]
Triglycerides (mg/dl)	105.7 \pm 55.3 ^a (87.9) [90.6; 120.8]	74.5 \pm 23.9 ^a (70.5) [68.0; 81.1]	86.3 \pm 36.3 (76.0) [76.4; 96.2]	94.0 \pm 52.7 (78.5) [79.6; 108.4]	90.1 \pm 45.2 (78) [81.5; 98.8]
Dietary intake					
Lutein ($\mu\text{g}/\text{day}$)	955.4 \pm 1418.1 (408.8) [568.4; 1342.5]	1190.8 \pm 1727.4 (410.5) [719.3; 1662.3]	903.9 \pm 1571.8 ^b (339.2) [474.9; 1333.0]	1242.3 \pm 1579.3 ^b (528.8) [811.3; 1673.4]	1073.1 \pm 1577.4 (410.5) [772.2; 1374.0]
Zeaxanthin ($\mu\text{g}/\text{day}$)	78.6 \pm 121.1 (31.8) [45.6; 111.7]	111.7 \pm 155.7 (48.9) [69.2; 154.2]	91.5 \pm 143.5 (33.0) [52.3; 130.7]	98.8 \pm 137.2 (46.3) [61.3; 136.2]	95.2 \pm 139.8 (38.1) [68.5; 121.8]
Lutein + zeaxanthin ($\mu\text{g}/\text{day}$)	1052.8 \pm 1531.6 (445.9) [634.8; 1470.9]	1283.7 \pm 1860.6 (452.5) [775.9; 1791.5]	995.4 \pm 1705.0 ^b (369.0) [530.0; 1460.8]	1341.1 \pm 1693.1 ^b (678.6) [879.0; 1803.2]	1168.3 \pm 1700.0 (451.0) [844.0; 1492.5]
Lutein + zeaxanthin/1000 Kcal ($\mu\text{g}/\text{day}$)	47.5 \pm 71.2 (21.2) [2.5; 323.9]	66.8 \pm 91.5 (26.0) [3.5; 379.0]	47.7 \pm 78.4 ^b (18.8) [2.4; 367.5]	66.6 \pm 85.4 ^b (31.9) [4.3; 335.3]	57.1 \pm 82.2 (23.8) [2.56; 329.4]
Macular pigment optical density (density units)					
MPOD (n = 216 eyes)	0.352 \pm 0.150 (0.360) [0.323; 0.382]	0.342 \pm 0.155 (0.350) [0.311; 0.373]	0.370 \pm 0.140 ^b (0.360) [0.341; 0.398]	0.325 \pm 0.158 ^b (0.320) [0.293; 0.356]	0.347 \pm 0.108 (0.360) [0.326; 0.370]

Table 1 Dietary intake and serum concentrations of lutein and zeaxanthin, macular pigment optical density, serum lipids and body mass index in Spanish subjects (n=108) expressed as mean \pm standard deviation, (median) and confidence interval [95% CI] (Continued)

Body mass index (kg/m ²)	24.9 \pm 2.2 ^a (25.0) [24.3; 25.4]	21.8 \pm 2.4 ^a (21.5) [21.2; 22.5]	22.7 \pm 2.8 ^b (22.6) [22.0; 23.5]	24.0 \pm 2.5 ^b (24.1) [23.3; 24.7]	23.4 \pm 2.7 (23.0) [22.8; 23.9]
--------------------------------------	---	---	---	---	--

Serum values are expressed as mean \pm standard deviation (each datum is the mean of three replicate injections), (median) and confidence interval [95% CI].

^a Significant difference between sexes ($p < 0.0001$).

^b Significant difference between age groups ($p < 0.0005$ for all variables, except for BMI $p = 0.002$).

HDL: high-density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; MPOD: macular pigment optical density.

sample ($p = 0.171$, $p = 0.012$), but no significant correlations were found in the younger group (Figure 1).

The MPOD showed age-specific correlations with lutein plus zeaxanthin expressed in relation to serum lipid concentrations as well as with the fruit and vegetable intake.

Multivariate regression analysis of dietary and biochemical factors associated with the MPOD

Table 5 corresponds to the regression model used to evaluate the predictive value of age, sex, lutein and zeaxanthin in diet and serum, also expressed in relation to serum lipids, cholesterol (total, HDL- and LDL-), triglycerides and fruit and vegetable intakes on the MPOD value. The table shows only results that do not include zero in the confidence interval. In the total sample, age and serum lutein were the main predictors of MPOD. The R^2 in the total sample was 11.2% (predictive variables: grams of fruit, age, lutein + zeaxanthin/HDL and serum lutein). However, upon analysis of the sample of

older subjects, the main predictor was the concentration of lutein plus zeaxanthin in serum related to the concentration of lipids (cholesterol plus triglycerides) and, to a lesser extent, sex (in this group, the men had higher MPOD than the women). The R^2 in the older subjects was 29.7% (predictive variables: sex, fruit in grams, vegetables in grams and lutein + zeaxanthin/cholesterol + triglycerides).

Discussion

Lutein status is routinely assessed together with zeaxanthin, using dietary or biochemical methods, both of which have advantages and limitations, although serum concentration has been considered the best method for establishing their nutritional status in humans [3]. Different factors linked either to the subject or to diet can influence their concentrations in serum and their bioavailability [3,7,10]. For this report, we selected a sample of apparently healthy subjects with similar serum lipids,

Table 2 Dietary intake of the major sources of lutein and zeaxanthin intake (g/day) and energy intake expressed as mean \pm standard deviation, (median) and confidence interval [95% CI]

	Men	Women	Aged 20–35 years	Aged 45–65 years	Total sample (n = 108)
Food groups (g/day)					
Fruit	225.4 \pm 197.4 (200.0) [171.5; 279.3]	223.4 \pm 178.6 (193.9) [174.6; 272.1]	150.4 \pm 119.5 ^b (151.9) [117.8; 183.0]	298.4 \pm 213.1 ^b (269.2) [240.2; 356.6]	224.4 \pm 187.3 (197.5) [188.7; 260.1]
Vegetables	280.8 \pm 158.1 (261.2) [237.6; 323.9]	269.1 \pm 140.1 (271.4) [246.6; 303.3]	238.0 \pm 128.4 ^b (231.0) [202.9; 273.0]	311.9 \pm 159.4 ^b (290.7) [268.4; 355.4]	275.0 \pm 148.8 (266.3) [246.6; 303.3]
Fruit + vegetables	506.2 \pm 278.2 (451.0) [430.3; 582.1]	492.5 \pm 265.6 (475.5) [420.0; 565.0]	388.4 \pm 190.2 ^b (410.3) [336.4; 440.3]	610.3 \pm 294.6 ^b (577.3) [529.9; 690.7]	499.3 \pm 270.8 (458.7) [447.7; 551.0]
Eggs	25.8 \pm 28.5 (21.3) [18.1; 33.6]	24.8 \pm 21.8 (21.3) [18.8; 30.7]	25.7 \pm 24.8 (21.3) [18.9; 32.4]	24.9 \pm 26.0 (20.7) [17.8; 32.0]	25.3 \pm 25.3 (21.3) [20.5; 30.1]
Energy intake (Kcal)	2334 \pm 584 ^a (2233) [2174; 2493]	1895 \pm 402 ^a (1904) [1785; 2004]	2096 \pm 494 (2072) [1961; 2231]	2133 \pm 597 (1994) [1970; 2296]	2114 \pm 546 (2054) [2010; 2218]

^aSignificant difference between sexes ($p < 0.001$).

^bSignificant difference between age groups ($p < 0.001$).

Table 3 Correlations (Spearman's ρ and (p value)) between lutein, zeaxanthin and major food sources for dietary intake and serum concentrations

<i>Serum</i> <i>Dietary intake</i>	Aged 20 – 35 years			Aged 45 – 65 years			Total sample		
	Lutein	Zeaxanthin	Lutein + Zeaxanthin	Lutein	Zeaxanthin	Lutein + Zeaxanthin	Lutein	Zeaxanthin	Lutein + Zeaxanthin
Lutein	0.266 (0.052)	0.250 (0.068)	0.274 (0.045)	0.135 (0.332)	0.200 (0.148)	0.160 (0.247)	0.250 (0.009)	0.228 (0.018)	0.257 (0.007)
Zeaxanthin	0.296 (0.030)	0.205 (0.136)	0.324 (0.017)	0.156 (0.258)	0.366 (0.007)	0.238 (0.083)	0.221 (0.022)	0.313 (0.001)	0.286 (0.003)
Lutein + zeaxanthin	0.313 (0.021)	0.281 (0.040)	0.314 (0.021)	0.145 (0.296)	0.227 (0.098)	0.173 (0.212)	0.256 (0.007)	0.212 (0.027)	0.277 (0.004)
Lutein + zeaxanthin (density)	0.312 (0.022)	0.286 (0.036)	0.316 (0.020)	0.072 (0.606)	0.201 (0.145)	0.119 (0.390)	0.211 (0.029)	0.195 (0.043)	0.239 (0.013)
Fruit	0.452 (0.001)	0.400 (0.003)	0.431 (0.001)	0.154 (0.266)	0.340 (0.012)	0.219 (0.111)	0.381 (0.000)	0.382 (0.000)	0.382 (0.000)
Vegetables	0.243 (0.076)	0.205 (0.138)	0.225 (0.101)	0.102 (0.463)	0.199 (0.149)	0.122 (0.379)	0.215 (0.025)	0.214 (0.026)	0.200 (0.038)
Fruit and vegetables	0.447 (0.001)	0.399 (0.003)	0.401 (0.003)	0.125 (0.368)	0.317 (0.020)	0.181 (0.189)	0.355 (0.000)	0.353 (0.000)	0.341 (0.000)
Eggs	0.055 (0.693)	−0.001 (0.996)	0.096 (0.492)	−0.293 (0.033)	−0.342 (0.012)	−0.327 (0.017)	−0.122 (0.210)	−0.193 (0.047)	−0.124 (0.203)

body weight and dietary habits (varied diet and no dietary supplements) from two different age groups having the same proportion of men and women. To our knowledge, this is the first study to simultaneously assess dietary and status markers of lutein and zeaxanthin (diet, serum and

MPOD) in Spanish subjects taking into account several confounding factors.

Serum lutein and zeaxanthin concentrations are similar to those reported in other groups of Spanish subjects [12] and somewhat lower than [4,10] or similar to [1,19,20]

Table 4 Statistically significant correlations (Spearman's ρ and (p value)) between lutein, zeaxanthin and major food sources for their intake in serum and diet with MPOD (two eyes/subject, n=216)

<i>Serum</i>	MPOD	
	Aged 45 – 65 years	Total sample
Lutein	0.204 (0.034)	
Zeaxanthin	0.267 (0.005)	
Lutein + zeaxanthin	0.223 (0.020)	
Lutein + zeaxanthin/cholesterol + triglycerides	0.262 (0.006)	0.170 (0.012)
Lutein/cholesterol + triglycerides	0.258 (0.007)	0.176 (0.009)
Zeaxanthin/cholesterol + triglycerides	0.298 (0.002)	0.152 (0.025)
Lutein/HDL cholesterol	0.239 (0.013)	
Zeaxanthin/HDL cholesterol	0.282 (0.003)	
Lutein + zeaxanthin/HDL-cholesterol	0.272 (0.004)	
Lutein + zeaxanthin/LDL-cholesterol	0.301 (0.002)	0.162 (0.017)
Cholesterol	−0.227 (0.018)	
Dietary intake		
Zeaxanthin	0.230 (0.017)	
Lutein (density)		−0.147 (0.030)
Fruit	0.318 (0.001)	0.160 (0.018)
Vegetables	0.255 (0.008)	
Fruit and vegetables	0.350 (0.000)	0.171 (0.012)

MPOD: macular pigment optical density; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein.

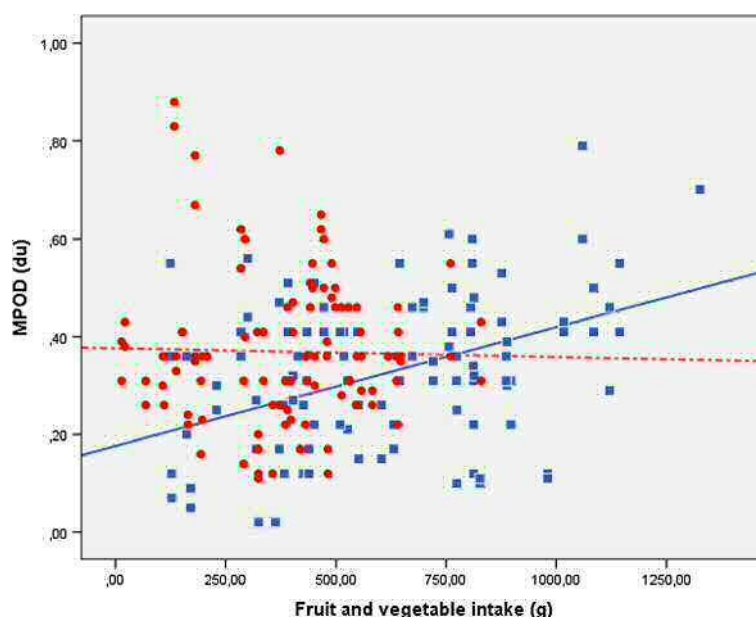


Figure 1 Correlation between MPOD (du) and fruit and vegetable intake (g) in the younger (circle and dotted line) ($r^2 = 0.001$) and older (square and solid line) ($r^2 = 0.188$) groups.

those of comparable age in several European and North American countries. Serum lutein concentrations in the present study, and in practically all those mentioned above, are much lower than the $>34 \mu\text{g/dL}$ ($0.6 \mu\text{mol/L}$) that seem to be consistently associated with lower risk in epidemiological studies (including lower risk for age-related macular degeneration and cataracts) and higher MPOD [3].

We observed no sex differences in serum concentrations and dietary intake of lutein and zeaxanthin or in MPOD, findings reported in a number of studies [4,20-22], although other authors observed higher intake in women [23]. In contrast, although cholesterol was within normal range, there were differences in serum lipids, and higher triglyceride and lower HDL-cholesterol levels were observed in men. However, serum lutein and zeaxanthin concentrations differed according to the age group, being higher in the older subjects. Their intake, both crude and

energy-adjusted, is also greater, as reported elsewhere [24], and this group consumes more fruits and vegetables, as well. These differences disappear when serum concentrations are related to levels of circulating lipids (lutein + zeaxanthin/cholesterol + triglycerides), transporters of these xanthophylls, which are being considered for a better interpretation of the antioxidant/nutritional status [11,25] or are expressed as 1000 kcal intake. The MPOD in the total sample was 0.35 du, similar to that of other studies [21,22,26], and differed according to age [17].

However, the amount of lutein plus zeaxanthin intake (median value) is much lower than that found by our group more than a decade ago in European subjects ($n = 400$) [27]. In that study, the intake in the Spanish subgroup ($n = 80$) was 3.25 mg/day (range: 1.8-4.3 mg/d), which contrasts with the 0.45 mg/d of this study, which, in turn, is similar to the mean intake in the Spanish population obtained in national surveys (0.5 mg and 0.1 mg/person/day

Table 5 Multivariate regression analysis of biochemical and dietary factors, sex and age data associated with MPOD

	β (SE)	p	95% CI
Total sample			
Constant	0.413 (0.036)	0.000	0.342, 0.485
Age	- 0.094 (0.023)	0.000	- 0.139, -0.048
Lutein (serum)	0.008 (0.003)	0.013	0.002, 0.014
Older group (45-65 y)			
Constant	0.246 (0.058)	0.000	0.131, 0.361
Sex	- 0.086 (0.027)	0.002	- 0.139, -0.032
Lutein + zeaxanthin/cholesterol + triglycerides	1.165 (0.491)	0.020	0.191, 2.140

MPOD: macular pigment optical density; SD: standard deviation; CI: confidence interval.

of lutein and zeaxanthin, respectively) [28]. It is also similar to the levels reported in other populations [10]. If we compare the mean intake usually found in the literature, rather than the median value (preferable since the data usually do not follow a normal distribution), the mean intake of 1.2 mg is similar or slightly below the range described in other studies [6,8,21,24].

The different intake levels found in the literature are largely attributable to the differences among databases for carotenoid composition in foods and the types of dietary questionnaires employed [12]. Regarding the aforementioned European study, the food composition data utilized are very similar to those used in this report [15] since, in both cases, much of the data resulted from HPLC analysis of Spanish foods; however, the European study was based on a semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ), whereas in the present study, 3-day food records were employed. FFQ have been reported to overestimate carotenoid intake [23], especially that of lutein and zeaxanthin when comparing these two methods [12]. FFQ were used in those studies in which intake concentrations were higher and 2 or 3-day recalls were employed in others in which the concentrations were comparable. On the other hand, the data from population-based studies in the USA and Spain indicate that levels of lutein and zeaxanthin intake have declined, particularly from dark-green leafy vegetables [29]. Another aspect to be considered regarding lutein intake is food seasonality; however, in the Spanish population, the mean intake of lutein has been reported to be relatively constant throughout the year [28].

Concerning the sex differences in lutein and zeaxanthin intake, the results in the literature are inconsistent, indicating a higher intake among women [22,23], in whom a lower energy intake [23] or no differences [21] are likewise reported. There are also discrepancies in the findings according to age group, with some studies that show no differences [4] and others that do; in the later, as in our study, a higher intake is reported for older individuals [24].

Lutein intake is higher than that of zeaxanthin in all populations [6,20]; in a typical western diet, a ratio of 7:1 (lutein:zeaxanthin) has been reported [8]. This is lower than that found in our study, which is 11:1 in the total sample and 13:1 in the older subjects, who consume more fruit and vegetables (Table 2) than the younger participants (10:1). The mean intake of fruits and vegetables is higher than that recommended by the WHO to decrease risk of chronic diseases (400 g/day).

The degree of correlation between lutein and zeaxanthin concentrations in serum and diet is significant, being higher if determined by dietary intake of fruit and vegetables, rather than by measuring the concentrations of these xanthophylls as provided by the diet (Table 3). The Pearson correlation coefficient between their serum

concentrations and dietary intake is >0.2 and is >0.3 when serum concentrations correlate with food consumed, as in other studies [8,21,22,26]. Aside from the amount ingested, the degrees of correlation between biological markers, apparently low, are influenced by many other subject-related factors (i.e. sex, age, BMI, eating habits, sample size), as well as metabolic factors [2,8], and in our study, the degrees of correlation were found to vary according to age group, but not sex. Thus, in younger subjects, there is a correlation between serum levels and dietary intake (in terms of both the concentrations of these compounds intake density) whereas, in older subjects correlation was observed only for zeaxanthin, despite the fact that these individuals have higher levels both in their intake and in serum. Therefore, other metabolic factors must influence metabolism of these xanthophylls, such as the uptake of lutein and zeaxanthin from plasma and their transport to the retina (e.g. serum lipid levels, or binding protein in optical tissue with binding capacity for zeaxanthin isomers, but not for lutein) [7]. Correlation in young subjects but not in their elders has been reported by other authors [19]. However, the correlations between serum concentrations and fruit and vegetable intake are significant in both age groups, especially for fruit intake.

The concentration of lutein and zeaxanthin in the retina, assessed by MPOD, was lower in the older subjects, despite the fact that their intake was higher than that of younger individuals (also expressed in relation to 1000 kcal). These higher intakes are reflected in the higher serum concentrations, although the differences disappear when the levels are expressed in relation to serum lipids. Correlations between MPOD and serum lutein and zeaxanthin and dietary intake reached the highest significance level for zeaxanthin and for lutein + zeaxanthin in relation to lipids (cholesterol + triglycerides, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol) and when related to diet (lutein density and fruits and vegetables) (Table 4). Lutein and zeaxanthin are transported in LDL and HDL in similar amounts and it is widely accepted that oxidative modifications of LDL and HDL affect lipoprotein metabolism and modified LDL may have an effect on retinal pigment epithelial cells [30].

There are significant correlations in the elderly group, but not in the younger group (except the correlation with the lutein intake expressed as concentration per 1000 kcal, [$p = -0.214$, $p = 0.026$]). Although, MPOD is often positively associated with dietary and serum lutein and zeaxanthin concentrations [26], conflicting results have been reported on the influence of sex [22], age [8], BMI [2,31], and other postprandial or environmental factors (e.g. smoking) [22]. The highest correlations between MPOD and lutein and zeaxanthin in serum and dietary intake correspond to fruit and vegetables ($p = 0.35$) and to lutein + zeaxanthin/HDL-cholesterol ($p = 0.301$); the latter is consistent with the identification of HDL as the specific

transporter of lutein and zeaxanthin to retina in chicks [32]. The strong correlation between MPOD and fruit and vegetable intake, also reported elsewhere [26], indicates that not only the amounts of lutein and zeaxanthin are important for ocular tissue; there are other micronutrients and bioactive compounds in these foods that are also beneficial (e.g. fiber and polyunsaturated fatty acid intake are also directly related to MPOD) [33]. On the other hand, few studies have assessed lutein and zeaxanthin status simultaneously using the three possible markers (diet, serum and MPOD) and these studies are not very homogeneous in terms of factors that can exert an influence such as sex, age, serum lipids and BMI, among others [21,22,26]. Nevertheless, although consistent associations among these three markers have not always been found, most studies point to the protective role of a diet rich in fruits and vegetables. However, in multivariate regression analysis, performed to assess the predictive value of lutein and zeaxanthin concentrations in serum and dietary intake, sex, age and the concentrations of different serum lipids for MPOD, only the serum lutein concentration and lutein + zeaxanthin in relation to cholesterol + triglycerides, but not fruit and vegetable intake, correlate with MPOD. Moreover, age is an important predictor in the total sample, as is sex in the older group, although we observed no sex differences in the MPOD values in this study, a fact that could be explained if the availability of lutein and zeaxanthin to the retina could be influenced by physiological sex differences [22] (i.e. if binding protein in optical tissue specific for zeaxanthin responds differently in men and women [7]).

Conclusions

In conclusion, lutein and zeaxanthin concentrations in serum and dietary intake of these xanthophylls and of their major food sources are higher in older vs younger subjects; however, MPOD is lower. In younger individuals, MPOD is influenced by serum lutein but, in older individuals, the presence of lutein plus zeaxanthin in relation to circulating lipids is a determining factor. Thus, when establishing normal/reference ranges for serum lutein and zeaxanthin, age ranges should be taken into account and the levels of these xanthophylls should be expressed in relation to the lipid concentration, at least in subjects over 45 years of age, as this could influence MPOD.

Abbreviations

MP: Macular pigment; MPOD: Macular pigment optical density; BMI: Body mass index; HDL: High density lipoprotein; LDL: Low density lipoprotein.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

BOA, CCV and BBdM conceived and designed the study; RES, CCV and BBdM acquired and evaluated the dietary data; RES and BOA analyzed the carotenoids in serum and visual data; BOA and BBdM performed the

statistical analysis and wrote the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank Maria Luisa García-González for technical support, Susana Jiménez-Redondo for their support in dietary assessment and Martha Messman for English editing.

Funding

This study was supported by grant from Acción Estratégica en Salud of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica, Spain) (grant no. P509/00681) and Rocío Estévez Santiago is the recipient of a JAEPreDoc grant from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), awarded under the program of the Junta para la Ampliación de Estudios, co-financed by the European Social Fund (ESF). We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

Author details

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), C/José Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, Spain. ²Department of Nutrition, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.

Received: 7 February 2014 Accepted: 27 May 2014

Published: 3 June 2014

References

1. Renzi LM, Hammond BR Jr, Dengler M, Roberts R: The relation between serum lipids and lutein and zeaxanthin in the serum and retina: results from cross-sectional, case-control and case study designs. *Lipids Health Dis* 2012, **11**:33.
2. Carpentier S: Associations between Lutein, Zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview. *Crit Rev Food Sci* 2009, **49**:313–326.
3. Granado F, Olmedilla B, Blanco I: Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Br J Nutr* 2003, **90**(3):487–502.
4. Cardinault N, Gorrand J-M, Tyssandier V, Grolier P, Rock E, Borel P: Short-term supplementation with lutein affects biomarkers of lutein status similarly in young and elderly subjects. *Exp Gerontol* 2003, **38**:573–582.
5. Lien EL, Hammond BR: Nutritional influences on visual development and function. *Prog Retin Eye Res* 2011, **30**:188–203.
6. Shardell M, Alley D, Hick G, El-Kamary S: Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr Res* 2011, **31**:178–189.
7. Thurnham DI: Macular zeaxanthins and lutein - a review of dietary sources and bioavailability and some relationships with macular pigment optical density and age-related macular disease. *Nutr Res Rev* 2007, **20**(2):163–179.
8. Beatty S, Nolan J: Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. *Arch Biochem Biophys* 2004, **430**:70–76.
9. Murray IJ: Macular pigment: characteristics and role in the older eye. In *The New Visual Neurosciences*. Edited by Werner JS, Chalupa LM. London, England: The MIT Press; 2014.
10. Curran-Celentano J, Hammond BR, Ciulla TA, Cooper DA, Pratt LM, Danis RB: Relation between dietary intake, serum concentrations, and retinal concentrations of lutein and zeaxanthin in adults in a Midwest population. *Am J Clin Nutr* 2001, **74**(6):796–802.
11. Gross M, Yu XH, Hannan P, Prouty C, Jacobs DR: Lipid standardization of serum fat-soluble antioxidant concentrations: the YALTA study. *Am J Clin Nutr* 2003, **77**(2):458–466.
12. Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Blanco-Navarro I, Botella-Romero F, Simal-Anton A: Assessment of carotenoid status and the relation to glycaemic control in type I diabetics: a follow-up study. *Eur J Clin Nutr* 2006, **60**(8):1000–1008.
13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972, **18**:499–502.
14. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C: *Tablas de Composición de Alimentos*. Madrid: Ediciones Pirámide; 2011.

15. Estévez-Santiago R, Beltrán-de-Miguel B, Cuadrado-Vives C, Olmedilla-Alonso B: **Software application for the calculation of dietary intake of individual carotenoids and of its contribution to vitamin A intake.** *Nutr Hosp* 2013, **28**(3):823–829.
16. van der Veen RLP, Berendschot TTJM, Hendrikse F, Carden D, Makridaki M, Murray IJ: **A new desktop instrument for measuring macular pigment optical density based on a novel technique for setting flicker thresholds.** *Ophthalm Phys Opt* 2009, **29**(2):127–137.
17. Makridaki M, Carden D, Murray IJ: **Macular pigment measurement in clinics: controlling the effect of the ageing media.** *Ophthalm Phys Opt* 2009, **29**(3):338–344.
18. MAPA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación) / FEN (Fundación Española de la Nutrición): *Valoración de la dieta española de acuerdo al panel de consumo alimentario del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA)*. Madrid, Spain: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino ed; 2008.
19. Nolan JM, Stack J, O'Connell E, Beatty S: **The relationships between macular pigment optical density and its constituent carotenoids in diet and serum.** *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2007, **48**(2):571–582.
20. Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJA, Blanco I, Gil-Martinez E, Berg H, Corridan B, Roussel AM, Chopra M, Thurnham DI: **Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries.** *Br J Nutr* 2001, **85**(2):227–238.
21. Hammond BR, Curran-Celentano J, Judd S, Fuld K, Krinsky NI, Wooten BR, Snodderly DM: **Sex differences in macular pigment optical density: relation to plasma carotenoid concentrations and dietary patterns.** *Vis Res* 1996, **36**(13):2001–2012.
22. Wenzel AJ, Sheehan JP, Burke JD, Lefsrud MG, Curran-Celentano J: **Dietary intake and serum concentrations of lutein and zeaxanthin, but not macular pigment optical density, are related in spouses.** *Nutr Res* 2007, **27**(8):462–469.
23. George SM, Thompson FE, Midthune D, Subar AF, Berrigan D, Schatzkin A, Potischman N: **Strength of the relationships between three self-reported dietary intake instruments and serum carotenoids: the Observing energy and protein Nutrition (OPEN) Study.** *Public Health Nutr* 2012, **15**(6):1000–1007.
24. Johnson EJ, Maras JE, Rasmussen HM, Tucker KL: **Intake of Lutein and Zeaxanthin differ with age, sex, and ethnicity.** *J Am Diet Assoc* 2010, **110**(9):1357–1362.
25. Wei W, Connor SL, Johnson EJ, Klein ML, Hughes S, Connor WE: **Effect of dietary lutein and zeaxanthin on plasma carotenoids and their transport in lipoproteins in age-related macular degeneration.** *Am J Clin Nutr* 2007, **85**(3):762–769.
26. Burke JD, Curran-Celentano J, Wenzel AJ: **Diet and serum carotenoid concentrations affect macular pigment optical density in adults 45 years and older.** *J Nutr* 2005, **135**(5):1208–1214.
27. O'Neill ME, Carroll Y, Corridan B, Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Van den Berg H, Hininger I, Roussel AM, Chopra M, Southon S, Thurnham DI: **A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study.** *Brit J Nutr* 2001, **85**:499–507.
28. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas Hidalgo E: **Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet.** *Eur J Clin Nutr* 1996, **50**(4):246–250.
29. Granado F, Blázquez S, Olmedilla B: **Changes in carotenoid intake from fruit and vegetables in Spanish population over the period 1964–2004.** *Public Health Nutr* 2007, **10**(10):1018–1023.
30. Du M, Wu M, Fu D, Yang S, Chen J, Wilson K, Lyons TJ: **Effects of modified LDL and HDL on retinal pigment epithelial cells: a role in diabetic retinopathy?** *Diabetologia* 2013, **56**(10):2318–2328.
31. Johnson EJ, Hammond BR, Yeum K-J, Qin J, Dong Wang X, Castaneda C, Snodderly DM, Russell RM: **Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density.** *Am J Clin Nutr* 2000, **71**:1555–1562.
32. Connor WE, Duell PB, Kean R, Wang Y: **The prime role of HDL to transport lutein into the retina: evidence from HDL-deficient WHAM chicks having a mutant ABCA1 transporter.** *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2007, **48**(9):4226–4231.
33. Mares J, LaRowe TL, Snodderly DM, Moeller SM, Gruber MJ, Klein ML, Wooten BR, Johnson EJ, Chappell RJ, CAREDS Macular Pigment Study Group and Investigators: **Predictors of optical density of lutein and zeaxanthin in retinas of older women in the carotenoids in age-related eye disease study, an ancillary study of the women's health initiative.** *Am J Clin Nutr* 2006, **84**:1107–1122.

doi:10.1186/1475-2891-13-52

Cite this article as: Olmedilla-Alonso *et al.*: Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women: dietary intake, serum concentrations, lipid profile and macular pigment optical density. *Nutrition Journal* 2014 **13**:52.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



BRITISH JOURNAL
of NUTRITION



CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

The importance of the food source and its color in the relationship between lutein and zeaxanthin intake from fruit, vegetable and eggs and their associations with nutritional status and the macular pigment optical density in Spanish subjects.

Journal:	<i>British Journal of Nutrition</i>
Manuscript ID:	BJN-RA-15-0791
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	21-Jul-2015
Complete List of Authors:	Estévez-Santiago, Rocío; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CISC), Metabolism and Nutrition Olmedilla-Alonso, Begoña; CSIC ICTAN: Inst. of Food Science, Technology and Nutrition, Dept. of Metabolism and Nutrition Beltrán-de-Miguel, Beatriz; Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Nutrición y Bromatología I Cuadrado-Vives, M Carmen; Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Nutrición y Bromatología I
Keywords:	lutein and zeaxanthin, dietary intake, fruit and vegetables , macular pigment optical density, serum concentrations
Subject Category:	Human and Clinical Nutrition

SCHOLARONE™
Manuscripts

The importance of the food source and its color in the relationship between lutein and zeaxanthin intake from fruit, vegetable and eggs and their associations with nutritional status and the macular pigment optical density in Spanish subjects.

Rocío Estévez-Santiago¹, Begoña Olmedilla-Alonso¹, Beatriz Beltrán-de-Miguel², Carmen Cuadrado-Vives²

¹ Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Madrid (Spain)
² Faculty of Pharmacy. Universidad Complutense of Madrid (Spain).

Corresponding author: B. Olmedilla-Alonso. ICTAN-CSIC. c/ José Antonio Novais, 10. Madrid-28008 (Spain). E-mail: BOLmedilla@ictan.csic.es Phone: (+34) 915492300 Fax: (+34) 5493627.

Short title: Food color sources, lutein, zeaxanthin, MPOD

Key words

Lutein, zeaxanthin, fruit, vegetables, dietary intake, macular pigment optical density.

ABSTRACT

Fruits, vegetable and eggs are major contributors to dietary intake of lutein and zeaxanthin. These xanthophylls accumulate selectively in the macula where they may protect against age-related eye diseases. Objectives: a) to assess the contributions of major sources of lutein and zeaxanthin and their association with blood concentrations and macular pigment optical density (MPOD) in Spanish volunteers; b) to evaluate them by food color. Lutein and zeaxanthin intake from fruits, vegetables and eggs were determined in 108 men and women (20-35 and 45-65 y), using standard dietary assessment methods and a country-specific carotenoid database. Previously published serum lutein and zeaxanthin concentrations and MPOD data were used. Parametric and non-parametric tests, general linear model and factor analysis were used for the statistical study. Vegetables were the major contributors (75%) to lutein+zeaxanthin intake, followed by eggs (10%) and fruits (4%). Vegetables supplied 86% and 84% and fruits 3% and 16% of the lutein and zeaxanthin intake, respectively. Green foods of plant origin supplied the highest amounts of lutein (78%) and zeaxanthin (52%), followed by red/orange (9% lutein, 38% zeaxanthin) and white/yellow (14% lutein, 9% zeaxanthin). MPOD was influenced by lutein ($p=0.012$) and zeaxanthin ($p=0.014$) from fruits, but not from vegetables or eggs. Regarding color, only lutein ($p=0.000$) and zeaxanthin ($p=0.020$) supplied by red/orange foods influenced MPOD. Vegetables and green foods of plant origin are major contributors to lutein and zeaxanthin intake. However, red/orange foods and the group of fruits, closely related categories, have the greatest influence on MPOD.

Introduction

High fruit and vegetable intake is considered to be an indicator of diet quality that is associated with a lower risk of several noncommunicable diseases ⁽¹⁾. Among the many components of this food group that could be responsible for said association, acting alone or in combination, are lutein and zeaxanthin ⁽²⁾. These compounds are plant pigments that belong to the well-known group of carotenoids, subgroup of the xanthophylls (oxycarotenoids), and are provided by the diet, mainly through vegetable, fruit and egg consumption ⁽³⁾. Both are transported in blood to the different tissues by lipoproteins ⁽⁴⁾ and are concentrated in retina, where they constitute what it is known as macular pigment. They act by filtering blue light and as antioxidants that may protect macular pigment from oxidative damage induced by light and by the high rate of oxidative metabolism in the eye. Both, but primarily lutein, have been investigated in relation to eye health and disease ⁽⁵⁾. There is increasing evidence suggesting that lutein and zeaxanthin may protect against age-related maculopathy, one of the major causes of blindness in the developed world ⁽⁶⁾.

Macular pigment density can be considered a marker of long-term dietary exposure ^(7; 8) and is often positively associated with dietary and serum lutein and zeaxanthin concentrations ⁽⁹⁾. To our knowledge, despite the fact that there are a number of studies on dietary intake of lutein and zeaxanthin ⁽¹⁰⁾, on the relationship between their intake from the whole diet and their concentrations in serum ^(11; 12), and on their relationship to chronic diseases as well as to eye health/disease ⁽⁵⁾, there is no data on the specific contribution of fruits, vegetables and eggs to dietary lutein and zeaxanthin intake and nutritional status, or on their association with macular pigment optical density (MPOD). This association would be influenced to a large extent by the differing bioavailabilities of carotenoids derived from different food matrices ^(4; 13). On the other hand, an increasing number of national and international agencies tend to emphasize the importance of eating fruits and vegetables of different colors ⁽¹⁴⁾ based on the understanding that different color could mean different phytochemicals, which would mean different health benefits ^(15; 16; 17).

In a recent study in two age groups of men and women, we assessed lutein and zeaxanthin status simultaneously using the three possible markers—diet, serum and MPOD, and reported a strong correlation between MPOD and fruit and vegetable consumption, as well as a higher correlation of fruit intake than vegetable intake with serum lutein and zeaxanthin concentrations ⁽⁹⁾. Thus, in order to examine the relationships among those markers of lutein and zeaxanthin status in depth, we undertook this study to assess the contributions of fruit, vegetable and egg consumption to dietary lutein and zeaxanthin intake and their association with blood concentrations and MPOD in two age groups of Spanish men and women. Moreover, as different colors are associated with different carotenoid profiles in foods (i.e. red/orange with a high content of β -cryptoxanthin and green color with lutein) and, thus, with the resulting impact on biomarkers / nutritional status, we

also proposed to investigate the associations of fruit and vegetable subgroups according to their color (red/orange, white/yellow, green).

Participants and methods

108 volunteers (54 men and 54 women), divided into two age groups (20 to 35 y and 45 to 65 y) (mean \pm SD: 25.6 ± 3.2 y and 52.4 ± 5.2 y, respectively) were enrolled in a cross-sectional study and underwent blood sampling, assessment of the MPOD and 3-day food records involving 24 h recalls. The recruitment and selection process, serum concentrations of lutein and zeaxanthin and the MPOD are published elsewhere⁽⁹⁾. The age groups were established because of their different dietary habits and risk of age-related ocular disease. A sample of 108 subjects (SD=0.10) was found to be necessary to obtain a 10% difference in the MPOD (0.04 du) with 85% power and an alpha error of 0.05⁽⁹⁾. Briefly, the inclusion criteria were normal cholesterolemia, body mass index under 30 kg/m² and mixed diet (no avoidance of any food groups). Volunteers were asked to report information on the following exclusion criteria: consumption of dietary supplements, BMI under 20 kg/m², surgery for myopia (within the previous year), cataracts or macular degeneration, use of drugs or phytosterol-enriched beverages/foods to control cholesterol level, regular consumption of n-3 fatty acid-enriched food products and chronic diseases that can affect carotenoid or lipid metabolism (i.e. diabetes, cardiovascular disease).

The participants were enrolled over the course of an entire year (during the spring and summer: 40 in the younger and 29 in the older age group; and, during the fall and winter: 14 in the younger and 25 in the older age group).

This study was conducted in accordance with the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human volunteers were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda of Madrid, Spain (registry no. 257, dated 19 July 2010). Written informed consent was obtained from all participants.

Dietary intake assessment

Recent dietary intake was evaluated using 3-day food records involving 24 h recalls, one of which coincided with a weekend or holiday, carried out within a period of 7 to 10 days. For the first recall, the participants underwent a face-to-face encounter with a specialized interviewer, normally the same person who, subsequently, performed the other two recalls by telephone. The amounts consumed were estimated in units (fruits), portions or household servings⁽³⁾. On the basis of this information, we calculated food intake in grams/day, which served as the basis for the determination of the daily lutein and zeaxanthin intake using a carotenoid database developed by our group, included in a software application for the calculation of dietary intake of individual

carotenoids^(18; 19). This carotenoid database contains data on the major dietary carotenoids present in foods, and all of them were generated by HPLC^(19; 20; 21) using an analytical procedure that is considered to be highly acceptable⁽²²⁾. The foods included, mainly from the plant kingdom, are major contributors to the intake of carotenoids in Europe^(23; 24). The food groups included in the software are: fruits and vegetables, oils and fats, snacks, nonalcoholic beverages, milk and dairy products, eggs and egg products, and sauces and seasonings. The individual lutein and zeaxanthin content of each of these items was multiplied by the amount consumed (g/person/day) and this provided an estimate of the intake of these xanthophylls in the whole diet, that was previously published⁽⁹⁾ and is included in table 1 for comparative purposes. In the present study, we focus on the amount of lutein and zeaxanthin supplied by fruits, vegetables and eggs, breaking the fruit and vegetable group down according to their color (red/orange, white/yellow, green).

The carotenoid database used⁽¹⁹⁾ includes data on lutein and zeaxanthin in 124 foods, expressed individually, except for that of 27 foods for which the literature provides data only on the combined lutein and zeaxanthin content (i.e. eggs and certain foods that were not frequently consumed by the participants in this study). Thus, the dietary intake of lutein and zeaxanthin is expressed individually and as the sum of the two, and, consequently, in some cases, the value for lutein+zeaxanthin does not coincide with the sum of the concentration of each. Of these 27 foods for which lutein and zeaxanthin are expressed as their sum, only 19 were registered in the dietary records by one or more volunteers.

As lutein and zeaxanthin in serum showed a high correlation with MPOD when these xanthophylls were expressed in relation to serum lipids (in older participants)⁽⁹⁾, we evaluated the lipid intake using a food composition table widely accepted in Spain⁽³⁾. The intake of total lipids and lipids divided according to the different families of fatty acids (monounsaturated fatty acids [MUFA], polyunsaturated fatty acids [PUFA] and saturated fatty acids [SFA]) are expressed in g/day.

Lutein and zeaxanthin analysis in blood

Lutein and zeaxanthin levels were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the procedure and results have been published elsewhere⁽⁹⁾. Briefly, the system used consisted of a model 600 pump, a Rheodyne injector and a 2998 photodiode array detector (Waters, Milford, MA, USA); a Spheri-5 ODS 5 µm (220 mm× 4.6 mm) chromatographic column (Brownlee Labs, Applied Biosystem, Santa Clara, CA, USA) with a guard column (Aquapore ODS type RP-18) were used. The mobile phase changed from acetonitrile-methanol (85:15; v/v), to acetonitrile-dichloromethane-methanol (70:20:10; v/v/v) in a linear gradient from min 5 to min 20 in a flow rate of 1.8 mL min⁻¹. Methanol was stabilized with ammonium acetate (0.025 molL⁻¹).

Detection was performed at a wavelength of 450 nm and chromatograms were processed using Empower 2 software (Waters, Milford, MA, USA). Carotenoid extraction was performed on serum samples using a slight modification of a previously published method ⁽²⁵⁾.

Macular pigment optical density assessment

Macular pigment optical density was assessed using an MPS 9000 desktop device (Macular Pigment Screener, Elektron PLC, Cambridge, UK) that applies the principles of heterochromatic flicker photometry. The technique and reliability of this device are described in detail by van der Veen et al. ⁽²⁶⁾. The MPOD was measured in density units (du) and ranges from 0 to 1. The procedure and results have been published elsewhere ⁽⁹⁾.

Statistics

Data are expressed as the mean and standard deviation, median and 95% confidence interval. To detect possible intergroup differences in the variables “age” and “sex”, the mean values were compared using parametric and nonparametric tests (Student t-tests and Mann Whitney-U test), given that it was difficult to confirm the normal distribution in some of the variables analyzed. In this way, we were able to confirm that the differences observed were not a consequence of the distribution of the variables. For the same reason, to detect possible differences between the lutein and zeaxanthin intake derived from the food groups, a parametric test (paired t-test) and a nonparametric test (Wilcoxon) were performed.

We analyzed the possible differences in the dependent variable “MPOD”, taking into account the factors “age” and “sex”. General linear model (GLM) analysis revealed that age had a significant effect on MPOD, and that there was an interaction between age and sex in the older age group.

The analysis of the relationships between the diet and serum variables was carried out using a Pearson correlation matrix. The analysis of the relationships between the main outcome measure “MPOD” and the intake variables was performed jointly by means of factor analysis and GLM (including sex, age and their interaction).

The factor analyses were performed, on the one hand, with dietary lutein and zeaxanthin intake from fruits, vegetables and eggs, and, on the other hand, with those intakes from foods classified according color. To assess the intakes from fruits, vegetables and eggs, and because the concentration of lutein and zeaxanthin in eggs is expressed jointly, the data on lutein and zeaxanthin introduced into the factor analysis was the lutein+zeaxanthin data. As eggs were not found to influence MPOD in the factor and GLM analyses, and since for the remainder of the foods there are

separate data for lutein and zeaxanthin, we undertook the analysis of the individual intakes of lutein and zeaxanthin from fruits and vegetables.

All reported P-values were based on a Monte Carlo exact test and on a two-sided test, and were compared to a significance level of 5%. SPSS v.21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software was used for all statistical calculations.

Results

Contribution of fruits, vegetables and eggs to dietary lutein and zeaxanthin intake

Table 1 shows the intakes of lutein and zeaxanthin from fruits, vegetables and eggs by the group as a whole and according to sex and age. Moreover, the table includes published data on the intake of lutein and zeaxanthin from the whole diet, on dietary fruit, vegetable and egg intake (grams) and on MPOD ⁽⁹⁾ for a better comprehension of the study.

The consumption of fruits and vegetables was similar in men and women, but was higher in the older age group compared to that of the younger volunteers. In contrast, there were no differences between the sexes or age groups in terms of egg consumption. Of the foods in the study, those most widely consumed were the vegetables, followed by fruits and eggs ⁽⁹⁾. The fruits consumed by the largest number of participants (no. consumers/no. participants · 100) were, for the overall study population: apple (36%), banana (36%), watermelon (22%), peach (21%), orange (17%) and melon (16%). Among the vegetables, those consumed by the largest number of participants were: onion (86%), potato (85%), tomato (84%), lettuce (61%), carrot (60%) and green pepper (35%).

There were significant differences among the contributions of fruits, vegetables and eggs to the dietary intake of lutein, zeaxanthin and lutein+zeaxanthin. In the overall sample, vegetables supplied 86% and 84% of the lutein and zeaxanthin intake, respectively. In contrast, fruits supplied only 3% and 16% of lutein and zeaxanthin, respectively. When combined lutein plus zeaxanthin intake was considered, vegetables were the major contributors (75%), followed by eggs (10%) and fruits (4%). Both xanthophylls are also supplied by other foods (11%), such as ketchup (group of sauces and seasonings) and orange and tomato juices (nonalcoholic beverage group).

The intake of lutein and zeaxanthin from the three food groups by men and women was similar for practically all the study variables. In contrast, there were a number of differences between the two age ranges, with higher amounts being ingested by the older group.

To determine whether the greater contribution of lutein and zeaxanthin from vegetables was due to a higher consumption of these foods (g) or to vegetables being richer in lutein and zeaxanthin than fruits and eggs, we calculated the amount of lutein+zeaxanthin per gram of food supplied by each of those food groups. Eggs were the food group that provided the most lutein+zeaxanthin per

gram (median, 5.46 µg/g), supplying nearly 4 times more than vegetables (median, 1.33 µg/g) and around 32 times more than fruits (median, 0.17 µg/g). Vegetables provided approximately 8 times more lutein+zeaxanthin than fruits.

Lutein and zeaxanthin intake according to the color of foods of plant origin

Table 2 shows the lutein and zeaxanthin intake from food groups analyzed according to the colors red/orange, white/yellow and green. There were significant differences in lutein, zeaxanthin and lutein+zeaxanthin intake from the three color groups, except in the intake of zeaxanthin when red/orange and green foods were compared.

The foods of plant origin that supplied the highest amount of lutein (78%) and zeaxanthin (52%) were those of green color, followed by red/orange (9% of lutein and 38% of zeaxanthin intake) and white/yellow (14% of lutein and 9% of zeaxanthin intake). Regarding lutein+zeaxanthin, the major contributors were foods of green color (64%); white/yellow and red/orange items supplied similar amounts (14% and 12%, respectively). Other foods that contributed with 10% were eggs and egg yolk, but were not considered in the calculation of the above percentages as they are not of plant origin.

As was the case with the intake of lutein and zeaxanthin from fruits, vegetables and eggs, there was little difference between men and women when the food sources were grouped according to their colors, although there were differences between the age groups (higher in the older group).

Of the fruits and vegetables classified in the red/orange group, those that were consumed by the largest number of individuals in the overall study group were: tomato (raw) (84%), carrot (raw and cooked) (60%), tomato (sauces) (46%), orange juice (48%) (25% from concentrates and 23% from natural juice), watermelon (22%) and peach (21%). Of the group of foods classified by color as white/yellow, the most widely consumed item was olive oil (99%), followed by onion (86%), potato (85%), banana and apple (36% each) and zucchini (25%). Finally, in the group of green produce, the leading items were green peppers (63%), lettuce (61%) and, to a much lesser extent, green beans (29%), peas (19%) and spinach (19%).

Correlations between lutein and zeaxanthin intake from fruits, vegetables and eggs and their serum concentrations

Table 3 shows the significant correlations between the concentrations of lutein, zeaxanthin and lutein+zeaxanthin in serum and the amounts of these carotenoids provided by fruits, vegetables and eggs, as well as those derived from the foods grouped according to color. In the overall sample, the variables that showed a higher number of significant correlations were the lutein and zeaxanthin intakes from fruits and from red/orange foods. In the group of fruits, the correlation coefficients

were, in general, < 0.2 , but in the group of red/orange foods, these coefficients were somewhat higher, ranging between 0.2 and 0.3. The lutein and zeaxanthin intakes from eggs exhibited no correlation with their concentrations in serum.

The number of variables that showed significant correlations between diet and serum was similar when the two sexes were compared (women showed higher correlation coefficients), but not in the comparison between age groups, in which the younger participants exhibited a greater number of correlations, with higher correlation coefficients ($p=0.474$ for lutein+zeaxanthin in red/orange foods).

Relationship between lutein and zeaxanthin intake and MPOD

To determine which of the three food groups studied (fruits, vegetables and eggs) had the greatest influence on MPOD, we performed factor analysis in which the intake of lutein+zeaxanthin from each of them was introduced (because there were no individual data for lutein and zeaxanthin in eggs). Table 4a shows that it was the intake derived from fruits (model 1) that had the closest direct relationship to MPOD.

The subsequent univariate GLM analysis of each of the variables included in the factor analysis (table 4a) ruled out a significant influence of the intake of lutein+zeaxanthin from eggs and vegetables on MPOD. However, the intake derived from fruits did have an influence ($p=0.007$), explaining 9.2% of the variance in MPOD. Sex, age and their interaction were included in all of the GLM analyses because of age-related differences (less marked among older vs younger individuals; $p=0.038$). In the older age group, sex was a predictor of MPOD (men had higher MPOD than women), as we reported elsewhere ⁽⁹⁾.

Once the influence of intake from eggs on MPOD had been ruled out, the intakes of lutein and zeaxanthin from fruits and vegetables were analyzed separately, as individual data for these foods are available. The component matrix of the factor analysis (table 4b) shows that the intakes of these xanthophylls from fruits were associated with greater saturation (model 2) and, thus, a closer direct relationship to MPOD.

Univariate analysis (GLM) revealed that the intakes of lutein and zeaxanthin from vegetables had no significant effect on the model, whereas significant effects were observed with lutein ($p=0.012$) and zeaxanthin ($p=0.014$) from fruits, whose models explain 8.8% and 8.7% of the variance in MPOD, respectively.

Considering MPOD in relation to the color of the foods ingested, red/orange, white/yellow or green, we applied factor analysis using variables identified with the intake of lutein and zeaxanthin from foods classified in those groups. Table 5 shows that lutein and zeaxanthin intake from

red/orange foods and lutein from white/yellow foods were the variables most closely related to MPOD, as indicated by the higher saturations obtained in factor 2.

Using GLM, we confirmed the influence on MPOD of lutein and zeaxanthin intake from foods in the red/orange group ($p=0.000$ and $p=0.020$, respectively), with lutein intake explaining 12.7% of the variance in MPOD and zeaxanthin intake, 8.4%. However, lutein and zeaxanthin derived from green and white/yellow foods had no significant effects in those models in which they were included, despite the fact that the vegetables and foods of green color were the major contributors to lutein and zeaxanthin intake. For this reason, and because the database includes a high proportion of vegetables among the foods classified as green (28 of 32), we used factor analysis to study whether the intake of lutein and zeaxanthin from fruits and vegetables was associated with the the intake of lutein and zeaxanthin from foods classified according to colors.

As can be seen in table 6, the intake of lutein and zeaxanthin from fruits was related to their consumption from red/orange and, to a lesser extent, from white/yellow items, and the intake of lutein from vegetables was related to their consumption from green foods. This relationship explains the results obtained in two previous analyses in which MPOD was associated with the consumption of lutein and zeaxanthin from fruits and red/orange foods and, to a lesser extent, of white/yellow foods. It could be said that the association between MPOD and the consumption of lutein and zeaxanthin from red/orange foods is due to its relation to their consumption from fruits, as this relationship is stronger (see saturation coefficients in tables 4b and 5), and most of the fruits are red/orange or white/yellow in color.

Finally, we calculated lipid intake to determine whether it was related to MPOD. Intake of lipids (g) and fatty acid families (g) for the total sample, expressed as mean \pm SD, [95% CI] and (median), were: lipids, 90.5 \pm 30.6 [86.4;94.6] (87.3); saturated fatty acids, 27.9 \pm 11.2 [26.4;29.4] (25.7); monounsaturated fatty acids, 38.7 \pm 14.4 [36.8;40.6] (36.5); and polyunsaturated fatty acids, 15.4 \pm 7.3 [14.5;16.4] (13.9). Factor analysis demonstrated that the intake of lipids, either total or classified by family, was not related to MPOD (data not shown).

Discussion

Lutein and zeaxanthin supplied by fruits, vegetables and eggs

In the present study, vegetables constitute the food group that supplies the highest amounts of lutein and zeaxanthin to the diet. This greater contribution is not due only to the fact that these foods are consumed in the largest quantities (g), but because the amount of lutein+zeaxanthin per gram is much higher than that in fruits. However, it is not greater than the amount in eggs, in which it is four-fold higher, but egg consumption (g) in the study population is 10 times lower than that of vegetables and, thus, their contribution to the total intake is smaller. To date, we have been unable

to find studies that provide information on the specific amounts of lutein and zeaxanthin provided by fruits, by vegetables and by eggs, although we do have data on intake from the total diet⁽¹⁰⁾, but we consider that knowledge of the individualized sources can facilitate nutritional intervention programs in public health designed to favor an increase in the macular pigment density in certain population groups.

Among the vegetables most widely consumed by the participants in this study are tomato and lettuce, foods of plant origin that are commonly consumed in Spain^(24; 27; 28). Other studies offer food consumption data expressed as a percentage of the total consumption in grams of the group to which a given food belongs⁽²⁹⁾. Although the comparison with our findings is difficult, it could be deduced that the fruits consumed in the greatest amounts in our study (apple, banana, watermelon, peach and orange) largely coincide with those most widely consumed by other population groups⁽²⁹⁾.

Fruits and vegetables present a broad range of colors, each of which is associated with different phytochemical profiles and, thus, with different biological activities⁽³⁰⁾. The carotenoids are also associated with certain colors: lycopene with red-colored foods, provitamin carotenoids with orange-colored foods and lutein and zeaxanthin with dark-green-colored foods⁽³¹⁾. The classification of fruits and vegetables according to the color of their edible portion is becoming increasingly common in recent years, especially for the establishment of public health dietary recommendations. One of the color-based food classifications is that proposed by the United States Department of Agriculture (USDA)⁽¹⁴⁾, which includes other criteria that do not refer exclusively to the color: botanical family, plant part, color and total antioxidant capacity. This classification establishes five subgroups, two of which are determined by color: dark green vegetables, red and orange vegetables, beans and peas, starchy vegetables and other vegetables. Among the recommendations for the population is to increase the consumption of green-colored foods (specifically green leafy vegetables)⁽¹⁴⁾, in order to increase the intake of lutein and zeaxanthin, among other substances of interest. Our findings agree both with this recommendation, as it was the green-colored foods that provided the highest percentage of lutein and zeaxanthin to the diet of our volunteers, and with the results of Moeller et al.⁽³²⁾.

The database on carotenoid content utilized in this study⁽¹⁹⁾ to determine the intakes of foods of plant origin, classified according to color, takes into account only the color of the edible portion, as occurs in other studies^(15; 16). However, the classification of foods according to color does not follow the same pattern in all the studies; for instance, apple is classified as a white fruit in this study and as yellowish in Mirmiran⁽¹⁵⁾; the USDA food pattern classifies green beans and avocados as “other vegetables”, but in the present study they are classified as green vegetables. With the exception of this aspect, and the fact that the data in this study are expressed as percentage of

consumers, whereas data from other studies represent the consumption of each food in grams, expressed as a percentage of the overall consumption in grams of all the foods in its color group, it could be said that many of the most widely consumed foods in the different studies coincide. Examples are tomato and derivatives (always in the red food group and always the item consumed in the greatest amount), apple (sometimes classified as white and sometimes as yellow), onion (white), orange and derivatives (red/orange and, on occasion, as a citrus fruit), and lettuce and spinach (in the green group). This shows that, as indicated by some authors ⁽²⁴⁾, a small number of foods constitute the major contributors to carotenoid intake in population groups.

Correlations of lutein and zeaxanthin supplied by fruits, vegetables and eggs with their concentrations in serum

Plasma carotenoid concentration is considered a marker of fruit and vegetable intake ⁽³³⁾. Specifically, serum lutein and zeaxanthin concentrations were much more strongly associated with fruit intake (Spearman coefficient=0.318) than with vegetable intake (Spearman coefficient=0.255) in a previous study involving the same participants included in the present study ⁽⁹⁾. In order to examine this aspect in greater depth, we assessed the relationship between serum lutein and zeaxanthin and lutein+zeaxanthin concentrations and their intake from fruits, vegetables and eggs. We observe that there are a greater number of correlations and with higher coefficients for lutein and zeaxanthin intake from fruits than from vegetables. However, there are studies reporting a higher correlation coefficient for vegetable intake (g) (Pearson coefficient =0.43) than for fruit intake (Pearson coefficient= 0.21) ⁽³³⁾, and different correlations according to sex, being higher for vegetables in a group of men, but similar for both fruits and vegetables among the women ⁽²⁹⁾ and, finally, other studies found no significant correlations ⁽³⁴⁾.

No significant correlation is observed between lutein and zeaxanthin supplied by eggs and the serum concentrations of these xanthophylls; nor is there any correlation between egg intake (grams) and serum lutein and zeaxanthin concentrations ⁽⁹⁾. Considering the high bioavailability of lutein and zeaxanthin from egg ⁽³⁵⁾, it is difficult to understand the lack of correlation found in this study, although perhaps it can be explained in part by the lower egg consumption (25 g) compared to the mean intake in the Spanish population (32 g) ⁽³⁶⁾ or by a low lutein and zeaxanthin content in the eggs consumed ⁽³⁷⁾.

As is widely known, lutein and zeaxanthin are associated with dark green foods. However, the red/orange food group has shown numerous correlations and the highest coefficients of the three groups, and lutein from green foods exhibited no significant correlation with blood concentrations. A lack of correlation between foods of green color (frequency of consumption) and serum lutein and zeaxanthin concentrations was recently reported ⁽³⁸⁾.

In general, the correlation coefficients between the intake of lutein and zeaxanthin and their concentrations in serum are low in all the studies in the literature ⁽²⁹⁾, a finding that might be explained by the wide variability in the carotenoid content in foods (i.e. post-harvest, cultivars, food preparation) ⁽³⁹⁾. It could also be related to the manner of expressing the data in food composition tables ⁽⁴⁰⁾ or be due to the variability in inter-individual responses ^(11; 41).

Relationship between lutein and zeaxanthin intake from fruits, vegetables and eggs and MPOD

The consumption of fruits, vegetables and eggs, major contributors to lutein and zeaxanthin intake, has been associated with MPOD ^(11; 32; 42), as has the lutein and zeaxanthin intake from the whole diet ^(10; 11; 32; 42). However, there are no studies that evaluate the lutein and zeaxanthin intake from fruits, vegetables and eggs, and foods classified by color, and, to the best of our knowledge, this is the first such study. As we reported elsewhere, the correlation between MPOD and fruits (grams) was higher than that with vegetables (in the older group), and there was no correlation with eggs ⁽⁹⁾. When dietary lutein and zeaxanthin intake from major contributors is assessed, we observe that the correlation between the amounts provided by fruits (ug/day) and MPOD is higher than that found with vegetables, and that there is no correlation with egg intake. On the other hand, in an epidemiological study assessing MPOD and fruit and vegetable intake, a lower risk of age-related macular degeneration has been associated with a higher intake of fruit but not of vegetables ⁽⁴³⁾.

The fact that the correlation between MPOD and lutein and zeaxanthin intake from fruits is higher than those from vegetables and from eggs, although fruits and vegetables both supply high amounts of lutein and zeaxanthin and eggs contain higher concentrations of these two xanthophylls, could be explained by a higher bioavailability of lutein and zeaxanthin from fruits. These xanthophylls are found in the ester forms in fruits ⁽⁴¹⁾, which could have a greater bioavailability than free forms ⁽⁴⁴⁾, although this explanation is not widely accepted ⁽⁴¹⁾. On the other hand, although the relationship between bioaccessibility or bioavailability of carotenoids and the different types of chromoplasts in which they are found is not clearly established ⁽⁴⁵⁾, the carotenoids in fruits are found mainly in chromoplasts and are more efficiently released by digestion than carotenoids in green vegetables, which are mainly located in chloroplasts ^(13; 45; 46). In this respect, the influence of possible interactions among carotenoids cannot be ruled out ^(47; 48).

Considering fruits and vegetables according to colors, those of green color were the foods that contributed the greatest amount of lutein and zeaxanthin to the diet of our volunteers. However, the red/orange foods are those that have the greatest influence on MPOD, and this color group is closely related to fruit consumption. Given that the relationship between MPOD and intake from fruits is stronger than its relationship to the intake from red/orange foods (coefficients of saturation 0.852 vs 0.714 for lutein and 0.795 vs 0.647 for zeaxanthin, tables 4b and 5) and that the variables

corresponding to intake from fruits, vegetables and eggs explain a higher proportion of the variance of the variable “MPOD” than do the variables of intake according to colors (proportion of variance explained: 83.26% vs 91.94%), we consider that the high significance of this relationship to the variable “red/orange color” is due to the fact that this variable is also strongly related to the variable “fruit consumption”.

Finally, as fat intake favors carotenoid bioaccessibility⁽⁴⁹⁾ and MPOD in the participants in this study showed age-specific correlations with lutein+zeaxanthin expressed in relation to serum lipid concentrations⁽⁹⁾, the lutein and zeaxanthin intake levels were studied in terms of the lipid intake (total lipids, saturated, MUFA and PUFA) to assess their relationship to MPOD. Although, there are significant positive correlations (Pearson coefficients), the influence of those intakes on MPOD were ruled out by means of factor analysis. This lack of a relationship to dietary lipid intake has been reported elsewhere⁽³²⁾ but not in another study in which PUFA intake was assessed⁽¹¹⁾.

Conclusions

The contribution of vegetables to the dietary intake of lutein and zeaxanthin is more than seven times greater than that of eggs and nearly twenty-fold that of fruits. Regarding food colors, the lutein and zeaxanthin supplied by red/orange foods showed the highest correlations with their serum concentrations in the younger participants.

Major contributors to lutein and zeaxanthin intake are green foods of plant origin, followed by red/orange and white/yellow foods. However, red/orange foods are those that have the greatest influence on MPOD and this color group is closely related to fruit intake.

Acknowledgements

This study was supported by grant from Acción Estratégica en Salud of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica, Spain) (grant no. PS09/00681) and Rocío Estévez Santiago is the recipient of a JAEPredoc grant from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain, awarded under the program of the Junta para la Ampliación de Estudios, co-financed by the European Social Fund (ESF).

The authors wish to thank Susana Jiménez-Redondo and M Teresa Herrero-Silva for their support in dietary assessment, and Laura Barrios and Belén Garzón-García from the Subdirección General de Apoyo a la Investigación (SGAI) of the CSIC for the statistical study assessment, and Martha Messman for English editing.

Referencias

1. WHO/FAO (2003) Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health: Promoting fruit and vegetable consumption around the world. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/> (accessed July 2015)
2. Shardell M, Alley D, Hick G et al. (2011) Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr Res* 31, 178-189.
3. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L et al. (2013) *Tablas de Composición de Alimentos*, 16 ed. Madrid: Ediciones Pirámide.
4. Maiani G, Periago-Castón M, Catasta G et al. (2009) Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res* 53, S194-S218.
5. Granado F, Olmedilla B, Blanco I (2003) Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Br J Nutr* 90, 487-502.
6. Loane E, Kelliher C, Beatty S et al. (2008) The rationale and evidence base for a protective role of macular pigment in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol* 92, 1163-1168.
7. Cardinault N, Gorrand J-M, Tyssandier V et al. (2003) Short-term supplementation with lutein affects biomarkers of lutein status similarly in young and elderly subjects. *Exp Gerontol* 38, 573-582.
8. Beatty S, Nolan J (2004) Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. *Arch biochem biophys* 430, 70-76.
9. Olmedilla-Alonso B, Beltran-de-Miguel B, Estevez-Santiago R et al. (2014) Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women: dietary intake, serum concentrations, lipid profile and macular pigment optical density. *Nutr J* 13.
10. Burke JD, Curran-Celentano J, Wenzel AJ (2005) Diet and serum carotenoid concentrations affect macular pigment optical density in adults 45 years and older. *J Nutr* 135, 1208-1214.
11. Mares J, LaRowe TL, Snodderly DM et al. (2006) Predictors of optical density of lutein and zeaxanthin in retinas of older women in the Carotenoids in Age-related Eye Disease Study, an ancillary study of the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr* 84, 1107-1122.
12. Thurnham DI (2007) Macular zeaxanthins and lutein - a review of dietary sources and bioavailability and some relationships with macular pigment optical density and age-related macular disease. *Nutr Res Rev* 20, 163-179.

13. Pee Sd, West CE, Permaesih D et al. (1998) Orange fruit is more effective than are dark-green, leafy vegetables in increasing serum concentrations of retinol and beta-carotene in schoolchildren in Indonesia. *Am J Clin Nutr* 68, 1058-1067.
14. USDA (2011) choosemyplate.gov-vegetable-food gallery-Commonly eaten vegetables in each subgroup. <http://www.choosemyplate.gov/food-groups/vegetables-foodgallery.html> (accessed July 2015)
15. Mirmiran P, Bahadoran Z, Moslehi N et al. (2015) Colors of fruits and vegetables and 3-year changes of cardiometabolic risk factors in adults: Tehran lipid and glucose study. *Eur J Clin Nutr*.
16. Oude Griep LM, Verschuren WMM, Kromhout D et al. (2011) Colors of Fruit and Vegetables and 10-Year Incidence of Stroke. *Stroke* 42, 3190-3195.
17. Thyagarajan B, Meyer KA, Smith LJ et al. (2011) Serum carotenoid concentrations predict lung function evolution in young adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr* 94, 1211-1218.
18. Estévez-Santiago R, Beltrán-de-Miguel B, Cuadrado-Vives C et al. (2013) Software application for the calculation of dietary intake of individual carotenoids and of its contribution to vitamin A intake. *Nutr Hosp* 28, 823-829.
19. Beltrán B, Estévez R, Cuadrado C et al. (2012) Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; Utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutr Hosp* 27, 1334-1343.
20. Olmedilla B, Granado F, Rojas-Hidalgo E (1993) Quantitation of provitamin and non provitamin A carotenoids in fruits most frequently consumed in Spain . In: *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*. pp. 141-145. [K Waldrom, I Johnson and GK Fenwich, editors].
21. Granado F, Olmedilla B, Blanco I et al. (1992) Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J Agric Food Chem* 40, 2135-2140.
22. West C, Poortvliet E (1993) The carotenoid content of foods with special reference to developing countries: VITAL, International Science and Technology Institute, Arlington, Virginia.
23. O'Neill ME, Carroll Y, Corridan B et al. (2001) A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br J Nutr* 85, 499-507.
24. Granado F, Olmedilla B, Blanco I et al. (1996) Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr* 50, 246-250.
25. Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Blanco-Navarro I et al. (2006) Assessment of carotenoid status and the relation to glycaemic control in type I diabetics: a follow-up study. *Eur J Clin Nutr* 60, 1000-1008.

26. van der Veen RLP, Berendschot TTJM, Hendrikse F et al. (2009) A new desktop instrument for measuring macular pigment optical density based on a novel technique for setting flicker thresholds. *Ophthalmic Physiol Opt* 29, 127-137.
27. del Mar Bibiloni M, Elisa Zapata M, Aragon JA et al. (2014) Estimation of antioxidants dietary intake in wet age-related macular degeneration patients. *Nutr Hosp* 29, 880-888.
28. Granado F, Blázquez S, Olmedilla B (2007) Changes in carotenoid intake from fruit and vegetables in Spanish population over the period 1964 - 2004. *Public Health Nutr* 10, 1018-1023.
29. Jansen M, Van Kappel AL, Ocke MC et al. (2004) Plasma carotenoid levels in Dutch men and women, and the relation with vegetable and fruit consumption. *Eur J Clin Nutr* 58, 1386-1395.
30. Heber D, Bowerman S (2001) Applying science to changing dietary patterns. *J Nutr* 131, 3078S-3081S.
31. Pennington JAT, Fisher RA (2010) Food component profiles for fruit and vegetable subgroups. *J Food Compos Anal* 23, 411-418.
32. Moeller SM, Volland R, Sarto GE et al. (2009) Women's Health Initiative Diet Intervention Did Not Increase Macular Pigment Optical Density in an Ancillary Study of a Subsample of the Women's Health Initiative. *J Nutr* 139, 1692-1699.
33. Campbell DR, Gross MD, Martini MC et al. (1994) PLASMA CAROTENOIDS AS BIOMARKERS OF VEGETABLE AND FRUIT INTAKE. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 493-500.
34. Wenzel AJ, Sheehan JP, Burke JD et al. (2007) Dietary intake and serum concentrations of lutein and zeaxanthin, but not macular pigment optical density, are related in spouses. *Nutr Res* 27, 462-469.
35. Thurnham DI, Northrop-Clewes CA, Chopra M (1998) Biomarkers of vegetable and fruit intakes. *Am J Clin Nutr* 68, 756-757.
36. Varela-Moreiras G et al. (2010) Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the food Consumption Survey: updated information. *Eur J Clin Nutr*, S37-S43.
37. Rasmussen HM, Muzhingi T, Eggert EMR et al. (2012) Lutein, zeaxanthin, meso-zeaxanthin content in egg yolk and their absence in fish and seafood. *J Food Compos Anal* 27, 139-144.
38. Mulokozi G, Lietz G, Svanberg U et al. (2003) Plasma levels of retinol, carotenoids, and tocopherols in relation to dietary pattern among pregnant Tanzanian women. *Int J Vitam Nutr Res* 73, 323-333.
39. Rodriguez-Amaya DB (2010) Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *J Food Compos Anal* 23, 726-740.

40. Granado F, Olmedilla B, Blanco I et al. (1997) Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: A user's point of view. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37, 621-633.
41. Bunea A, Socaciu C, Pintea A (2014) Xanthophyll Esters in Fruits and Vegetables. *Not Bot Horti Agrobi* 42, 310-324.
42. Ciulla TA, Curran-Celantano J, Cooper DA et al. (2001) Macular pigment optical density in a midwestern sample. *Ophthalmology* 108, 730-737.
43. Cho EY, Seddon JM, Rosner B et al. (2004) Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 122, 883-892.
44. Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Castro-Feito J et al. (2008) Bioavailability of lutein (free and ester forms) in humans: assessment using exposition and functional biomarkers. *Acta Biochim Pol* 55, 4-5.
45. Schweiggert RM, Mezger D, Schimpf F et al. (2012) Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato. *Food Chem* 135, 2736-2742.
46. Cheng CY, Chung WY, Szeto YT et al. (2005) Fasting plasma zeaxanthin response to *Fructus barbarum* L. (wolfberry; Kei Tze) in a food-based human supplementation trial. *Br J Nutr* 93, 123-130.
47. Wang Y, Illingworth DR, Connor SL et al. (2010) Competitive inhibition of carotenoid transport and tissue concentrations by high dose supplements of lutein, zeaxanthin and beta-carotene. *European J Nutr* 49, 327-336.
48. Tyssandier V, Cardinault N, Caris-Veyrat C et al. (2002) Vegetable-borne lutein, lycopene, and beta-carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in human. *Am J Clin Nutr* 75, 526-534.
49. Hornero-Mendez D, Minguez-Mosquera MI (2007) Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innov Food Sci Emerg* 8, 407-412.

Table 1. Dietary intake (µg/day) of lutein, zeaxanthin and lutein+zeaxanthin from fruits, vegetables and eggs, intake of foods (g) and MPOD.*

Dietary intake (µg/day)		TOTAL SAMPLE (n=108)				MEN (n=54)				WOMEN (n=54)				20-35 YEARS (n=54)				45-65 YEARS (n=54)			
		Mean	SD	95% CI	Media n	Mean	SD	95% CI	Media n	Mean	SD	95% CI	Media n	Mean	SD	95% CI	Media n	Mean	SD	95% CI	Media n
Fruits	g/day†	224.4	186.9	189.5, 257.3	197.5	225.4	196.5	188.7, 263.4	200.0	223.4	177.7	189.5, 257.3	193.9	150.4 ^b	119.0	127.7, 173.1	151.9	298.4 ^b	212.1	258.7, 339.3	269.2
	L	37.4	38.3	32.3, 42.6	22.5	31.9 ^a	39.4	24.3, 39.4	15.2	43.0 ^a	36.5	36.1, 50.0	39.0	24.4 ^b	27.9	19.1, 29.7	13.4	50.5 ^b	42.7	42.3, 58.6	47.4
	Z	15.5	28.3	11.7, 19.3	0.0	13.9	29.2	8.4, 19.5	0.0	17.0	27.5	11.8, 22.3	0.0	8.2 ^b	14.9	5.3, 11.0	0.0	22.8 ^b	35.8	16.0, 29.7	0.0
	L+Z	53.4	59.7	45.4, 61.4	34.1	46.7 ^a	64.7	34.4, 59.0	17.2	60.2 ^a	53.8	49.9, 70.5	51.2	32.6 ^b	36.7	25.6, 39.6	19.5	74.3 ^b	70.3	60.9, 87.7	68.2
Vegetables	g/day†	274.9	148.4	242.5, 295.7	266.3	280.8	157.3	250.8, 310.8	261.2	269.1	139.4	242.5, 295.7	271.4	238.0 ^b	127.8	213.6, 262.4	231.0	311.9 ^b	158.7	281.6, 342.2	290.7
	L	921.5	1567.7	711.3, 1131.8	248.1	815.4	1415.0	545.5, 1085.3	256.4	1027.7	1706.9	702.1, 1353.3	191.8	781.3 ^b	1558.1	484.1, 1078.5	180.8	1061.8 ^b	1571.9	761.9, 1361.6	323.9
	Z	79.6	139.0	61.0, 98.2	22.0	64.6	119.0	41.9, 87.3	19.7	94.6	155.6	64.9, 124.3	25.3	83.3	142.4	56.1, 110.5	23.5	75.9	136.1	49.9, 101.9	15.6
	L+Z	1080.4	1727.9	848.7, 1312.2	317.9	996.8	1610.5	689.6, 1304.0	305.3	1164.1	1841.5	812.8, 1515.4	330.7	902.5	1714.1	575.5, 1229.4	264.3	1258.4	1731.2	928.2, 1588.7	399.9
Eggs	g/day†	25.3	25.2	21.9, 28.7	21.3	25.9	28.4	20.5, 31.3	21.3	24.8	21.7	20.6, 28.9	21.3	25.7	24.6	21.0, 30.4	21.3	24.9	25.9	20.0, 29.9	21.3
	L+Z	143.2	139.8	124.5, 162.0	116.4	149.8	157.6	119.7, 179.8	116.4	136.7	119.8	113.8, 159.5	116.4	145.4	138.6	119.0, 171.8	116.4	141.0	141.7	114.0, 168.1	116.4
Total diet	L†	1073.1	1573.7	862.1, 1284.2	410.5	955.4	1411.5	686.2, 1224.7	408.8	1190.8	1719.3	862.9, 1518.8	410.5	903.9 ^b	1564.5	605.5, 1202.3	339.2	1242.3 ^b	1571.9	942.5, 1542.2	528.8
	Z†	95.1	139.5	76.4, 113.8	38.1	78.6	120.6	55.6, 101.6	31.8	111.6	155.0	82.1, 141.2	48.9	91.5	142.9	64.2, 118.7	33.0	98.7	136.6	72.7, 124.8	46.3
	L+Z†	1449.4	1742.0	1215.8, 1683.0	745.1	1380.2	1641.4	1067.1, 1693.3	736.9	1518.6	1842.2	1167.2, 1870.0	761.2 ^b	1240.0	1736.0	908.9, 1571.2	632.3	1658.8 ^b	1730.7	1328.7, 1989.0	941.9
MPOD†		0.35	0.16	0.33, 0.37	0.36	0.35	0.16	0.32, 0.38	0.36	0.34	0.16	0.31, 0.37	0.35 ^b	0.37	0.15	0.34, 0.40	0.36	0.32 ^b	0.16	0.29, 0.36	0.32

MPOD, macular pigment optical density.

L, Lutein

Z, zeaxanthin

L+Z, Lutein+zeaxanthin

^a Significant differences between sexes

^b Significant differences between age groups.

* There are significant differences among the contributions of fruits, vegetables and eggs.

Table 2. Dietary intake ($\mu\text{g/day}$) of lutein, zeaxanthin and lutein+zeaxanthin from foods classified by color.*

Dietary intake ($\mu\text{g/day}$)		TOTAL SAMPLE (n=108)				MEN (n=54)				WOMEN (n=54)				20-35 YEARS (n=54)				45-65 YEARS (n=54)			
		Mean	SD	95% CI	Median	Mean	SD	95% CI	Median	Mean	SD	95% CI	Median	Mean	SD	95% CI	Median	Mean	SD	95% CI	Median
White/yellow	L	147.5	58.2	139.7, 155.3	139.8	142.5	56.5	131.7, 153.2	134.1	152.5	59.8	141.1, 163.9	141.6	133.9 ^a	54.5	123.5, 144.3	124.5	161.1 ^a	58.9	149.8, 172.3	152.6
	Z	9.4	9.4	8.1, 10.6	6.3	10.6 ^a	8.4	9.0, 12.2	9.2	8.2 ^a	10.2	6.3, 10.1	6.3	10.3	10.5	8.3, 12.3	6.8	8.5	8.1	6.9, 10.0	6.3
	L+Z	199.3	149.9	179.2, 219.4	161.6	196.5	164.4	165.2, 227.9	161.6	202.1	134.6	176.4, 227.8	161.8	182.1 ^a	132.0	156.9, 207.3	149.0	216.5 ^a	164.7	185.1, 248.0	171.0
Red/orange	L	94.0	66.1	85.2, 102.9	87.8	98.0	72.1	84.2, 111.7	88.9	90.1	59.6	78.7, 101.5	85.4	73.3 ^a	50.9	63.5, 83.0	61.5	114.8 ^a	72.9	100.9, 128.7	107.6
	Z	36.4	55.9	28.9, 43.9	14.9	23.4 ^a	34.2	16.8, 29.9	3.4	49.4 ^a	69.1	36.2, 62.5	27.8	30.6	54.8	20.2, 41.1	15.6	42.1	56.7	31.3, 52.9	14.0
	L+Z	172.6	137.1	154.2, 191.0	152.2	183.9	158.5	153.7, 214.2	148.1	161.3	111.4	140.1, 182.6	153.3	134.3 ^a	89.5	117.3, 151.4	130.3	210.9	163.7	179.7, 242.2	177.8
Green	L	835.5	1563.9	622.2, 1041.0	146.6	721.7	1411.5	446.7, 983.3	166.5	948.2	1700.5	623.8, 1272.6	126.3	703.2 ^a	1564.6	399.4, 994.1	113.0	948.2 ^a	1700.5	669.0, 1263.9	126.3
	Z	49.3	129.5	32.0, 66.7	0.0	44.6	118.9	21.9, 67.3	0.0	54.1	139.7	27.4, 80.7	0.0	50.5	137.5	24.3, 76.8	0.0	54.1	139.7	24.9, 71.4	0.0
	L+Z	933.4	1706.8	704.5, 1162.3	164.7	848.2	1583.0	546.3, 1150.2	186.9	1018.6	1825.7	670.3, 1366.9	139.9	776.5 ^a	1689.1	454.3, 1098.6	133.1	1090.4 ^a	1717.8	762.7, 1418.0	240.6

L, Lutein

Z, zeaxanthin

L+Z, Lutein+zeaxanthin

^a Significant differences between sexes.^b Significant differences between age groups.

* There are significant differences among contributions from white/yellow, red/orange and green foods, except between zeaxanthin intake from red/orange and green foods.

Table 3. Statistically significant correlations (Pearson correlation coefficients and (*p*-value)) between serum concentrations of lutein and zeaxanthin and dietary intake of those carotenoids according to food source ^a (n=108)

		Serum concentration (µg/dl)														
		TOTAL SAMPLE			MEN			WOMEN			20-35 YEARS			45-65 YEARS		
Dietary intake (µg/day)		Lutein	Zeaxanthin	Lutein+zeaxanthin	Lutein	Zeaxanthin	Lutein+zeaxanthin	Lutein	Zeaxanthin	Lutein+zeaxanthin	Lutein	Zeaxanthin	Lutein+zeaxanthin	Lutein	Zeaxanthin	Lutein+zeaxanthin
Vegetables	Lutein														0.194 (0.044)	
	Zeaxanthin		0.172 (0.011)	0.149 (0.029)				0.193 (0.046)	0.291 (0.002)	0.267 (0.005)			0.195 (0.043)		0.263 (0.006)	
	Lutein+zeaxanthin		0.185 (0.006)	0.174 (0.010)		0.216 (0.025)	0.195 (0.044)								0.323 (0.001)	0.215 (0.025)
Fruits	Lutein	0.176 (0.01)	0.177 (0.009)	0.159 (0.020)	0.198 (0.040)	0.222 (0.021)	0.199 (0.039)									
	Zeaxanthin		0.180 (0.008)		0.216 (0.025)	0.391 (0.000)	0.246 (0.010)				0.242 (0.012)	0.220 (0.022)	0.240 (0.012)			
	Lutein+zeaxanthin	0.173 (0.011)	0.200 (0.003)	0.170 (0.012)	0.229 (0.017)	0.313 (0.001)	0.240 (0.012)				0.229 (0.017)		0.199 (0.038)			
White/ yellow foods	Lutein	0.218 (0.001)	0.160 (0.019)	0.203 (0.003)				0.314 (0.001)	0.196 (0.042)	0.313 (0.001)	0.326 (0.001)	0.256 (0.008)	0.319 (0.001)			
	Zeaxanthin															
	Lutein+zeaxanthin												0.205 (0.034)			
Red/ orange foods	Lutein		0.202 (0.003)			0.261 (0.006)									0.236 (0.014)	
	Zeaxanthin	0.146 (0.032)	0.275 (0.000)	0.206 (0.002)		0.272 (0.004)		0.200 (0.038)	0.321 (0.001)	0.313 (0.001)	0.410 (0.000)	0.333 (0.000)	0.433 (0.000)		0.214 (0.026)	
	Lutein+zeaxanthin	0.204 (0.003)	0.286 (0.000)	0.229 (0.001)		0.264 (0.006)		0.277 (0.004)	0.329 (0.001)	0.333 (0.000)	0.451 (0.000)	0.395 (0.000)	0.474 (0.000)		0.215 (0.025)	

Green foods	Lutein															
	Zeaxanthin														0.241 (0.012)	
	Lutein+ zeaxanthin		0.171 (0.012)	0.166 (0.014)		0.208 (0.031)	0.193 (0.045)								0.310 (0.001)	0.222 (0.021)

^a Lutein and zeaxanthin intake from eggs showed no significant correlations with lutein and zeaxanthin concentrations in serum.

There were no significant differences in serum zeaxanthin concentrations between sexes or age groups (mean±SD: 2.56±1.36; 95% confidence interval: 1.12-7.20; median: 2.84), nor in serum lutein concentrations between sexes (11.58 ±6.17; 3.38-37.46; 12.83), but significant differences in serum lutein concentrations were found between the 45-65 y group (13.03±6.61; 5.22-37.46; 14.76) and the 20-35 y group (9.90±5.02; 3.38-7.46; 10.90). [9]

Table 4a. Component matrix of the factor analysis including MPOD and intake of lutein+zeaxanthin from fruits, vegetables and eggs (two eyes/participant, n=216)

Component matrix ^a				
	Component			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Lutein+zeaxanthin from fruits	0.731			0.676
Lutein+zeaxanthin from vegetables	-0.338	0.505	0.777	0.164
Lutein+zeaxanthin from eggs	0.291	0.849	-0.381	-0.223
MPOD	0.647	-0.150	0.475	-0.578

Extraction method: principal component analysis.

^aFour components extracted.

MPOD: macular pigment optical density.

Table 4b. Component matrix of the factor analysis including MPOD and intake of lutein and zeaxanthin from fruits and vegetables (two eyes/participant, n=216)

Component matrix ^a				
	Component			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Lutein from fruits	-0.230	0.852	-0.173	-0.437
Zeaxanthin from fruits	-0.379	0.795	-0.172	0.441
Lutein from vegetables	0.940	0.251		
Zeaxanthin from vegetables	0.922	0.310		
MPOD		0.307	0.948	

Extraction method: principal component analysis.

^aFour components extracted.

MPOD: macular pigment optical density.

Table 5. Component matrix of the factor analysis including MPOD and intake of lutein and zeaxanthin from foods classified by color (white/yellow, red/orange or green) (two eyes/subject, n=216)

Component matrix ^a				
	Component			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Lutein from white/yellow foods	0.240	0.677	0.419	-0.246
Zeaxanthin from white/yellow foods	0.108	0.213	0.880	
Lutein from red/orange foods	0.179	0.714	-0.180	
Zeaxanthin from red/orange foods		0.647	-0.479	-0.305
Lutein from green foods	0.972	-0.172		
Zeaxanthin from green foods	0.967	-0.168		
MPOD		0.420	-0.142	0.877

Extraction method: principal component analysis.

^aFour components extracted.

MPOD: macular pigment optical density.

Table 6. Component matrix of the factor analysis including intake of lutein and zeaxanthin from foods classified by color (white/yellow, red/orange or green) and from fruits and vegetables (two eyes/participant, n=216)

Component matrix ^a			
	Component		
	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Lutein from fruits		0.823	
Zeaxanthin from fruits	-0.139	0.830	-0.136
Lutein from vegetables	0.984		
Zeaxanthin from vegetables	0.955		
Lutein from white/yellow foods	0.135	0.478	0.624
Zeaxanthin from white/yellow foods			0.889
Lutein from red/orange foods		0.769	
Zeaxanthin from red/orange foods		0.709	-0.304
Lutein from green foods	0.983		
Zeaxanthin from green foods	0.983		

Extraction method: principal component analysis.

^aThree components extracted.

1



Food & Function

Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in major β -cryptoxanthin food contributors to its intake in the Spanish population.

Journal:	<i>Food & Function</i>
Manuscript ID	FO-ART-10-2015-001242
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	13-Oct-2015
Complete List of Authors:	Estévez-Santiago, Rocío; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Metabolism and Nutrition Olmedilla-Alonso, Begoña; ICTAN (CSIC), Metabolism and Nutrition Fernández-Jalao, Irene; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)

SCHOLARONE™
Manuscripts



Journal Name

ARTICLE

Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in major β -cryptoxanthin food contributors to its intake in the Spanish population.

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

R. Estévez-Santiago^a, B. Olmedilla-Alonso^a and I. Fernández-Jalao^a

Provitamin A carotenoids (β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin) contribute to the dietary intake of vitamin A and are associated with decreased risk of many chronic diseases. Besides their contents in foods, their bioavailability is of great interest since it represents the amount that will be absorbed in the gut (bioaccessibility). The aims of this study were to adapt, for the first time, the *in vitro* digestion model suitable for food, proposed in a consensus paper by Minekus *et al.* (2014), to assess the bioaccessibility of carotenoids from the fruits that are the major contributors to the intake of the provitamin A carotenoid, β -cryptoxanthin, in Spain (orange, tangerine, red pepper, peach, watermelon, and persimmon) and loquat. The highest β -cryptoxanthin content and the lowest bioaccessibility was found in mandarin and loquat (13331.6 and 929.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ respectively), whereas the highest contents of β -carotene and α -carotene were recorded in red pepper (1135.3 and 90.4 $\mu\text{g}/100\text{g}$ respectively). The bioaccessibility of β -cryptoxanthin was similar to that of β -carotene (0.02–9.8% and 1–9.1%, respectively) and was higher than that of β -carotene in red pepper, watermelon and peach. α -Carotene bioaccessibility ranged between 0% and 4.6%. We discuss the critical factors for comparing our data: the form of the food being analyzed (raw/cooked/previously frozen, in the presence or absence of oil/fat) and the protocol for bioaccessibility assessment. Different food processing techniques may increase carotenoid bioaccessibility compared to raw food. However, given the difficulties encountered when comparing the results of studies on bioaccessibility, it seems logical to propose the application of a standardized protocol.

Introduction

Carotenoids are plant pigments with an important role in nutrition since, for most of the population, some of these compounds (β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin) are the major contributors to their dietary intake of vitamin A^{1, 2} an essential nutrient for normal growth and development, eyesight and immune response. Carotenoid intake is also associated with decreased risk of many chronic diseases^{2, 3}. The human body does not synthesize carotenoids and therefore depends on diet as their source.

Besides the contents of carotenoids in foods, their

bioavailability is of great interest since it represents the amount of carotenoids that will be absorbed in the gut and will be available for use or storage by the body.⁴

This information is of growing interest to establish effective nutrition intervention programs. Although bioavailability varies depending on the type of carotenoid and food matrix^{2, 5} in the calculation of the contribution of carotenoids with vitamin A activity to the intake of vitamin A, it is assumed, based on theoretical yield, that the bioavailabilities of α -carotene and β -cryptoxanthin are equal and that both contribute in the same proportion to vitamin A intake, each being half the bioconversion factor of β -carotene in the formulas used to express vitamin A activity (retinol activity equivalents [RAE] or retinol equivalents [RE]).⁶ However, β -cryptoxanthin, the most important provitamin A xanthophyll in the human diet, mainly supplied by fruits of red/orange color, as other xanthophylls, seems to be more

^a *Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) (Madrid, Spain)*
See DOI: 10.1039/x0xx00000x

efficiently absorbed and converted into retinol than the carotenes (i.e., α -carotene).^{1,7}

Carotenoid bioaccessibility and bioavailability are generally quite low in raw fruits and vegetables, as a consequence of the lipophilic nature of these compounds and the complex structural organization in which they are embedded. They need to be released from the cellular matrix and incorporated into the lipid fraction during digestion before being absorbable.^{8,9} The bioavailability of carotenoids depends on many factors, which can be intrinsic (e.g., physiological state, homeostatic control, sex), environmental or dietary (e.g., chemical state of the components in the intestine, amount ingested, interactions with other components of the diet). Bioavailability is assessed using *in vivo* or *in vitro* (digestion, cellular, *in silico*) models. *In vitro* models provide information on the pre-absorption phase of bioavailability and, subsequently, on the fraction of bioactive compounds released from the food during digestion and made available for absorption (bioaccessibility). The *in vitro* models were developed as a simple, low cost and reproducible tool for studies of stability, digestive micellization and intestinal transport, as well as to predict the bioavailability of the food components. Although the information they afford is incomplete, as it does not include data on host-related factors, a prerequisite for carotenoid bioavailability is the bioaccessibility in the gut.^{2,9,10}

In vitro methods attempt to mimic physiological conditions *in vivo*, simulating digestion processes, and typically include the oral, gastric and small intestinal phases, and, occasionally, large intestinal fermentation. The majority of the methods reported in the literature are static and, although they all take into account the presence of digestive enzymes, pH, digestion time and salt concentrations, among other factors, the models vary widely in the use of those parameters, making it quite difficult to compare results and deduce overall findings from the information that can be gathered.^{9,11} A standardized digestion method was needed, and a general method to be applied for various endpoints has recently been proposed in a consensus paper by Minekus *et al.*¹¹

The aims of this study were to adapt the *in vitro* method proposed by Minekus *et al.* to assess the bioaccessibility of provitamin A carotenoids (β -cryptoxanthin, β -carotene and α -carotene), particularly that of β -cryptoxanthin, from the fruits that are the major contributors to the intake of vitamin A in Spain.

Material and methods

Foods

The plant foods analyzed are the major contributors to the dietary intake of β -cryptoxanthin in the Spanish population that also contain β -carotene¹²: orange (Lane Late navel variety), tangerine (Tango variety), red pepper, peach, watermelon, and persimmon. Loquat is a fruit of seasonal consumption and was analyzed because of its high β -cryptoxanthin and β -carotene content.¹³

Sample preparation

We analyzed fresh produce, purchased at a local market. Starting with 0.5 to 1.0 kg of each food, the nonedible portion was

removed and the edible portion was homogenized using a kitchen blender. The analysis of the carotenoid content and *in vitro* digestion were done immediately thereafter, always on the same day. Three 5-g samples were weighed for *in vitro* digestion and three 10–25-g samples for composition analysis.

In vitro digestion method

This method was based on the standardized static *in vitro* digestion model suitable for food, proposed in a consensus paper, within the COST Infogest network¹¹, with several modifications to enable us to assess carotenoid bioaccessibility.

The *in vitro* digestion method included the oral, gastric and small intestinal phases followed by separation of the supernatant. Reagents and phases were those proposed by Minekus *et al.*¹¹ Simulated digestion fluids were used as follows: for the oral phase, a simulated salivary fluid (pH 7) (SSF); in the gastric phase, a simulated gastric fluid (pH 3) (SGF); and in the duodenal phase, a simulated intestinal fluid (pH 7) (SIF). Enzyme solutions were prepared using those fluids as solvents. Within the options offered by this protocol, we introduced certain modifications in order to adapt it to the assessment of provitamin A carotenoids.

As fruits and vegetables contain starch, we included the oral phase in the model, using α -amylase. In the gastric phase, pepsin was added. In the duodenal phase, the consensus protocol suggests the possibility of using pancreatin or individual enzymes; we chose pancreatin as it is the enzyme most widely employed in the studies published to date and because it is less costly than using individual enzymes. In this phase, cholesterol esterase was added, as it has been reported to be important in the assessment of the bioaccessibility of xanthophylls, present mainly in ester forms, as it acts to hydrolyze them.¹⁴ Finally, we added bile salts in the form of bile extract for the same reasons we used pancreatin.

Briefly, the protocol was as follows: 5 grams of homogenized sample were weighed in triplicate. In the oral phase, the following reagents were added at 37°C: 3.5 mL of SSF, 0.5 mL of α -amylase (1500 U/mL), and 25 μ L of a CaCl_2 solution (0.3 M); finally, distilled water was added to a final volume of 10 mL, and the sample was introduced into a shaker bath at 37°C for 2 minutes. Upon completion of that phase, the sample was placed in an ice bath and the following reagents were added, at 37°C, to initiate the gastric phase: 7.5 mL of SGF, 1.6 mL of pepsin solution (25 000 U/mL), and 5 μ L of a CaCl_2 solution (0.3 M); pH was adjusted to 3 ± 0.2 using 6 M HCl, and distilled water was added to a final volume of 20 mL. The sample was again placed in the shaker bath at 37°C for 2 hours. pH was not readjusted throughout phases because our laboratory is not equipped with an automatic titrator and manual readjustment requires too much time, during which samples are not under the adequate conditions. After the 2 hours, the sample was again placed in an ice bath and the duodenal phase initiated by adding the following reagents: 10 mL of SIF (in the consensus protocol¹¹ 11 mL are added, but in our modification, 1 mL of SIF was used to dissolve the cholesterol esterase), 1 mL of cholesterol esterase solution (3.08 U/mL), 5 mL of pancreatin solution (800 U/mL of trypsin activity), 2.5 mL of bile salt solution (160 mM bile salts) and 40 μ L of CaCl_2 solution (0.3 M). At this point, pH was adjusted to 7 ± 0.2 using 1 M NaOH, and distilled water was added to a final volume of 40 mL. Samples were placed in the shaker bath at 37°C for another 2 hours, after which they were cooled (to 10–15°C) in an ice bath or water. Finally, the

supernatant was collected after centrifuging at 10 000 g for 10 minutes, and frozen (for a maximum of 1 week) until extraction.

The *in vitro* digestion method applied in this study indicates that the enzymes must be incorporated according to their enzyme activity.¹⁴ This activity, as well as the bile salt concentration of the bile extract, should be assessed on the basis of previously described protocols.¹⁵ The procedures followed in the present study are described below.

Enzymatic assay of α -amylase

This assay was based on the following definition of enzyme activity unit: one α -amylase unit liberates 1.0 mg of maltose from starch in 3 minutes at pH 6.9 at 20°C. The protocol is described elsewhere.¹⁵ Briefly, a 1% starch solution in phosphate buffer was incubated for 3 minutes, under the conditions described above, with 3 different α -amylase concentrations (between 0.33 and 0.50 μ /mL in the test tube prior to enzyme inactivation) in order to produce 3 different concentrations of maltose. Maltose was reacted with sodium potassium tartrate and 3,5-dinitrosalicylic acid (color reagent). This mixture was subjected to 15 minutes at boiling temperature during which it took on color, which was measured by spectrophotometry at 540 nm and maltose was quantified against a standard curve with concentrations ranging between 0.001% and 0.033%.

Enzymatic assay of pepsin

The enzyme activity unit was defined as follows: one unit will produce an increase in absorbance of 0.001/min at $\lambda=280$ nm at pH 2 and 37°C, measured as trichloroacetic acid (TCA)-soluble products. The protocol is described elsewhere.¹⁵ Briefly, different amounts of pepsin were added to the substrate solution (2% hemoglobin). The protocol suggests the use, for instance, of concentrations between 0.8 μ g/mL and 5 μ g/mL, but in order to ensure linearity in the measurement of absorbance, enzyme was added to reach concentrations between 3.3 and 7.5 μ g/mL in the reaction cuvette. The mixture was incubated for exactly 10 minutes at 37°C. Pepsin acted on the hemoglobin and TCA-soluble aromatic amino acids (tyrosine) was released. Then, 5% TCA was added to each sample to stop the reaction. Hemoglobin was precipitated by centrifugation at 6000 g \times 30' at 4°C and absorbance of the supernatant was measured. The increase in absorbance of the sample over the blank under the conditions described above was calculated.

Enzymatic assay of pancreatin (trypsin activity)

According to the protocol,¹⁵ the amount of pancreatin added to the *in vitro* digestion sample should be determined on the basis of the trypsin activity. Although it also indicates that the amylase and lipase activity of pancreatin should be measured, this was not done for economic reasons.

The trypsin activity assay is based on the following enzyme activity unit: 1 trypsin unit hydrolyzed 1 μ mol of TAME (p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester) per minute at 25°C, pH 8.1. This hydrolysis released p-toluene-sulfonyl-L-arginine, which absorbs light at $\lambda=247$ nm under the conditions described. To determine the μ mol of TAME hydrolyzed per minute, absorbance was measured every 29 seconds during 10 minutes. This assay was

performed with a concentration of the enzyme in the cuvette in the cuvette ranging from 0.3 to 0.6 μ g/mL.

Enzymatic assay of cholesterol esterase

As the use of cholesterol esterase is not mentioned in the consensus protocol,¹⁵ in order to measure its enzyme activity, we chose a widely used enzymatic assay,¹⁶ and for the purpose of simplifying the assay and lowering its cost, we used a kit for clinical use for the determination of the free cholesterol concentration in blood, that was based on the same fundamentals and used the same reagents, several of which were contained in a single solution. The fundamentals were as follows: 1 unit of cholesterol esterase caused the formation of 1 micromole of hydrogen peroxide (0.5 micromoles of quinoneimine dye) per minute under the conditions described below. The approach was based on the fact that when a cholesterol ester came into contact with the enzyme, there was a release of free cholesterol, the concentration of which was measured with the kit as follows: it was oxidized by the action of the cholesterol oxidase, producing hydrogen peroxide, which reacted with 4-aminoantipyrine and phenol to yield quinoneimine dye and producing an increase in absorbance, which was measured by spectrophotometry at 500 nm at 37°C every 30 seconds. All these reagents were contained in a solution provided with the kit (R reagent).

The cholesterol ester (in this case, cholesterol linoleate) was dissolved in isopropanol, after which it was diluted in a 1% hot triton X100 solution to obtain a concentration of the ester of 0.39 mg/mL. This was allowed to cool and sodium cholate was added. The enzyme was dissolved in 2% BSA and a 1:10 dilution was prepared in phosphate buffer at pH 7 to obtain a concentration of 0.085 mg/mL.

Cholesterol linoleate was added to the spectrophotometric cuvette (to reach a concentration in the cuvette of 0.052 mg/mL), followed by addition of R reagent and buffer for dilution. We then waited the time necessary for the previously free cholesterol in the ester solution to react with the R reagent, after which 0.1 mL of enzyme were added (of buffer in the blank), and measurements were made every 30 seconds. The enzyme activity was calculated on the basis of the slope of the initial linear portion of the absorbance curve.

Assay for bile salt concentration in the bile extract

To measure the bile salt concentration in the bile extract, we used an assay based on the following reaction: in the presence of NAD, 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase oxidized bile acids, leading to the formation of thio-NADH, the concentration of which was determined by the increase in absorbance at 405 nm. For this assay, we employed a kit for clinical use that provided all the reagents necessary for measurement in serum samples. For this reason, as the solvent for bile extract, we utilized a mixture of sera in which the bile salt concentration was previously determined. The assay was performed in accordance with the instructions provided with the kit. Briefly, we measured the increase in absorbance at 405 nm at 37°C between seconds 60 and 120, after having combined the reagents (serum bile extract with concentrations in the reaction cuvette of between 0.05 and 0.26 mg/mL, and kit reagents). The concentration was obtained by comparing said increase with that of a calibrator of known concentration subjected to the same procedure.

Extraction, saponification and HPLC analysis of carotenoids

Extraction was performed according to the procedure of de Rosso.¹⁷ Briefly, sample homogenate (10–25 g depending on the color) was ground with celite in a mortar and extracted with acetone; this was repeated until the extract was colorless. It was then transferred to a mixture of diethyl ether/petroleum ether (1:1) in a separatory funnel and the acetone was eliminated with water. Extraction was repeated until the aqueous extract was colorless. Possible remains of water were eliminated with anhydrous sodium sulfate and the sample was taken to dryness in a rotary evaporator. It was reconstituted in the injection solvent Methyl tert-butyl ether/Methanol (MeOH/MTBE) (70:30), and passed through a 0.45- μ m filter. Each sample was injected once or twice, thus yielding between 3 and 6 chromatograms for each food.

The carotenoids present in the extract after *in vitro* digestion were extracted in duplicate, with diethyl ether. The aqueous and gas phases were separated with 10% NaCl and centrifugation at 10 000 g at 4°C for 10 min. Then, once the complete elimination of water had been ensured by addition of anhydrous sodium sulfate, the extract was taken to dryness in a rotary evaporator, it was reconstituted in MeOH/MTBE (70:30), and passed through a 0.45- μ m filter. Each sample was injected 2 or 3 times, thus yielding between 6 and 9 chromatograms for each food.

To hydrolyze carotenoid esters and clear the carotenoid extract of interfering substances, such as chlorophylls and unwanted lipids, the extraction of carotenoids (from raw foods) was followed by alkaline saponification of the extract according to the procedure of Granado *et al.*,¹⁸ with slight modifications. Small aliquots were taken of the extracts of each food (three initial weighings) and were saponified (1 of them in duplicate) as follows. A small aliquot was taken of the extract and was mixed with 0.1 M pyrogallol acid in ethanol and with KOH in 30% methanol, and was subjected to ultrasonication for 7 min. The extract was then washed with water and extracted with a 1:1 mixture of diethyl ether : petroleum ether, with vortexing and centrifugation, and, finally, the supernatant was desiccated/dried in a nitrogen atmosphere, and was reconstituted in MeOH/MTBE (70:30) to be injected onto High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Saponification was carried out only in the undigested food samples, since a test run in the extract of digested loquat, a food with a high β -cryptoxanthin content, showed that the irremediable loss of carotenoids derived from saponification resulted in the nearly total absence of carotenoids in the sample.

The HPLC analysis was performed using a system consisting of a model 600 pump, a Rheodyne injector and a 2998 photodiode array (PDA) detector (Waters, Milford, MA, USA). The system included a C30 YMC column (5 μ m, 250 \times 4.6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, MA) with a guard column (Aquapore ODS type RP-18) using as mobile phase a linear gradient of MeOH with 0.1% triethylamine (TEA)/MTBE from 95:5 to 70:30 in 30 min, to 50:50 in 20 min, and maintaining this proportion for 35 min. The flow rate was 0.9 mL/min. All chromatograms were processed using Empower 2 software (Waters, Milford, MA, USA). Identification was carried out by comparing retention times with those of authentic standards and on-line UV-VIS spectra. Considering that the amounts of *cis* isomers were close to the limit of quantification and, in most samples, they were absent, the tentative identification was carried out based on comparison of elution order and the peaks in the

absorbance spectrum with the literature.¹⁷ Quantification was performed using standard curves for β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene. Due to the variability in the carotenoid contents among the foods analyzed and between the raw foods and the extract after *in vitro* digestion, two curves were used for each carotenoid. All three carotenoids had the same concentration at each point of the curve. The values in the higher curve ranged between 1 μ g/mL and 12 μ g/mL with $R^2=0.992$ for α -carotene, $R^2=0.992$ for β -carotene and $R^2=0.991$ for β -cryptoxanthin. Those of the lower curve ranged between 0.05 μ g/mL and 1 μ g/mL and R^2 was 0.995, 0.995, 0.997 for α -carotene, β -carotene and β -cryptoxanthin, respectively. *Cis*-isomers were quantified against the corresponding all-*trans* carotenoid.

Results and discussion

Table 1 shows the β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene content in each food and in the supernatant after *in vitro* digestion, as well as their bioaccessibility, defined as the percentage of the initial content in the food, and expressed in μ g/100 g of food (mean \pm SD). Carotenes were quantified in nonsaponified samples and β -cryptoxanthin in saponified extracts. These carotenoids were present in all-*trans* form and as *cis*-isomers in red pepper (9-*cis*- α -carotene and 9-*cis*- and 13-*cis*- β -carotene), as well as in persimmon, loquat and peach (9-*cis*- β -carotene). The highest β -cryptoxanthin content was found in mandarin and loquat, whereas the highest contents of β -carotene and α -carotene were recorded in red pepper. When the amounts of these carotenoids were expressed as percentages of the total provitamin A carotenoids in the foods analyzed, the percentage of β -cryptoxanthin was highest in persimmon and those of β -carotene and α -carotene were highest in watermelon and orange, respectively.

Other authors have reported higher, lower, and similar β -carotene contents in red peppers^{5, 19–23} and higher in persimmon²⁴, and similar levels of β -cryptoxanthin have been found in both fruits^{5, 20, 23, 25}. All three provitamin A carotenoids are present in oranges, but the reported contents differ widely among studies^{26–31}, especially for β -cryptoxanthin^{5, 28–30, 32}. Mandarin has the same provitamin A carotenoid profile as orange, but the contents of β -carotene and β -cryptoxanthin in the present study were higher than those shown in other reports³². In watermelon, we found a content of β -carotene similar^{28, 29} and higher³³ to that reported in other studies, and that of β -cryptoxanthin was similar³⁴, probably because it was analyzed at the start of the watermelon season. Other authors have reported higher and lower content of β -carotene in loquat^{5, 35} and lower content of β -cryptoxanthin than in this study^{5, 35}. Peach contained β -cryptoxanthin and all-*trans* β -carotene in concentrations similar to those found in other studies^{28, 29}, and α -carotene and 9-*cis* β -carotene were identified.

The wide disparity in carotenoid profiles reported in different studies is due to a number of factors related to the food (variety, climate, geographic location, season, ripening stage at harvest, part of the plant analyzed, agricultural practices, and postharvest handling, processing and storage, among others),^{2, 36} and to the analytical procedure, such as the instrumental technique employed (HPLC, spectrophotometry, etc.) and whether or not it includes saponification^{2, 36}, and how the results are expressed.³⁷

In vitro digestion

Given the importance of knowing the fraction of carotenoids that is available for absorption, we assessed not only the content, but the bioaccessibility, as well. For this purpose, we used the recently published consensus protocol designed to harmonize and validate *in vitro* digestion models and facilitate the comparison of results from different studies.¹¹ The main feature of the protocol is the incorporation of enzymes on the basis of their activity, which must be determined in each of the reagents employed using assays described in an appended document, as well as a procedure for assessing the bile salt concentration in the bile extract,¹⁵ since the findings for enzyme activity differ depending on the protocol used to measure them.

Please do not adjust margins



Journal Name

ARTICLE

Table 1. Carotenoid content in food (µg/100g) and in supernatant (SN) (µg/100g food) and percent bioaccessibility (BA) of carotenoids after *in vitro* digestion expressed as mean ±SD.

	β-cryptoxanthin			all-trans-α-carotene			9-cis-α-carotene			all-trans-β-carotene			9-cis-β-carotene			13-cis-β-carotene		
	Food	SN	BA	Food	SN	BA	Food	SN	BA	Food	SN	BA	Food	SN	BA	Food	SN	BA
Red pepper	282.58 ± 17.47	17.84 ± 7.78	6.31 ± 2.75	90.42 ± 4.86	3.21 ± 1.40	3.55 ± 1.55	297.51 ± 20.66	6.05 ± 2.71	2.04 ± 0.91	1135.26 ± 140.64	39.33 ± 15.11	3.46 ± 1.33	86.83 ± 16.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	50.04 ± 7.21	4.85 ± 1.70	9.70 ± 3.40
Persimmon	215.58 ± 71.36	1.72 ± 0.29	0.80 ± 0.13	6.29 ± 3.78	0.29	4.61				38.93 ± 4.19	3.53 ± 5.09	9.08 ± 13.07	14.56 ± 8.09	0.38	2.58			
Orange	84.67 ± 1.34	0.90 ± 0.34	1.07 ± 0.40	16.12 ± 1.39	0.14 ± 0.09	0.87 ± 0.53				24.20 ± 6.13	0.44 ± 0.10	1.80 ± 0.40						
Mandarin	1331.63 ± 372.73	3.77 ± 1.23	0.28 ± 0.09	12.35 ± 1.54	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00				547.04 ± 44.75	8.25 ± 1.26	1.51 ± 0.23						
Watermelon	1.22 ± 0.53	0.12 ± 0.01	9.84 ± 1.16							57.63 ± 4.77	3.52 ± 1.51	6.10 ± 2.62						
Loquat	929.19 ± 104.27	0.19 ± 0.04	0.02 ± 0.00	34.79 ± 2.34	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00				613.16 ± 53.95	0.64 ± 0.03	0.10 ± 0.01	14.91 ± 4.47	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00			
Peach	59.01 ± 50.33	1.97 ± 1.15	3.35 ± 1.94							35.62 ± 5.26	0.55 ± 0.23	1.55 ± 0.63	5.19 ± 1.89	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00			

Please do not adjust margins



Journal Name

ARTICLE

Among the provitamin A carotenoids, the bioaccessibility of β -cryptoxanthin was higher than that of β -carotene in red pepper, watermelon and peach. β -cryptoxanthin showed a percent bioaccessibility ranged between 0.02% and 9.84% (Table 1). Our results are similar to those reported by other authors for orange³², red pepper^{21, 22} and loquat⁵, and lower for mandarin³² and red pepper²³. In this regard, the food matrix appears to influence bioaccessibility, as different findings have been reported by authors using the same protocols for the same carotenoid, but in different food matrices.⁵ In the present study, the lowest bioaccessibility of β -cryptoxanthin was found in mandarin and loquat, foods having the highest content of this carotenoid.

There are few data on the carotenoid bioaccessibility in fruits; most of them refer only to β -carotene and very few to α -carotene and β -cryptoxanthin. The bioaccessibility of β -carotene in the present study was similar to that of β -cryptoxanthin and ranged between 0.1% and 9.08% (Table 1), and is similar to that found in other studies analyzing foods that were not cooked and foods with no added oil / fat (Table 2), important variables that make it difficult to compare different studies. For example, some authors have reported a β -carotene bioaccessibility of around 0% in a typical salad³⁸⁻⁴⁰, which increased to up to 20% when a fat source was added⁴⁰. In orange-fleshed sweet potato, an important source of vitamin A in many countries, similar percentages were described with and without fat addition (from 0.6% to 3%)^{41, 42}. In other studies (Table 2) analyzing green pepper²³, cassava^{43, 44}, banana⁴⁵, wild garlic, baby leaf salad, orange, yellow and red peppers⁴⁶, carrot, tomato⁴⁷, broccoli, spinach, lettuce, tomato paste, carrot, red pepper, kiwi, pineapple and loquat⁵ and, again, orange-fleshed sweet potato^{48, 49}, higher bioaccessibility values are reported and the potential influencing factors are commented on below.

Regarding α -carotene, the percentage after the digestion assay ranged between 0% and 4.61%, depending on the food (Table 2), with values similar to those obtained by others in salads³⁸⁻⁴⁰ and orange-fleshed sweet potato⁴², but lower than some found for yellow and red pepper⁴⁶, carrot^{5, 46, 47}, and banana⁴⁵ (Table 2).

Factors affecting bioaccessibility

The bioaccessibility of carotenoids in foods is known to be influenced by aspects related to the food (variety, ripening stage, preparation of the food, etc.) and by analytical factors (extraction and saponification methods, *in vitro* digestion protocol, etc.).² Among those factors, we comment on those we found to be critical for comparing the data of the present study: the form of the food being analyzed (raw / cooked / previously frozen, in the presence or absence of oil / fat) and the protocol for bioaccessibility assessment.

A) Sample preparation: Thermal processing facilitates cell wall disruption, followed by the release of the carotenoids from the food matrix and increased bioaccessibility, as has been reported in cassava^{43, 50}, banana⁴⁵, orange-fleshed sweet potato^{48, 49}, corn⁵¹,

carrot and tomato⁴⁷, and broccoli³⁷. In the present study, foods were analyzed in raw form because that is how they are consumed (with the exception of peppers, which are consumed raw or cooked), and although differences could be expected with respect to heat-processed foods, similarities were found for sweet potato⁴², sorghum⁵² and orange-fleshed sweet potato⁴¹.

Freezing foods prior to analysis also affects bioaccessibility as it facilitates the release of carotenoids and access to the enzymes present in the food. Thus, high bioaccessibility from samples that were frozen prior to the digestion process is reported in cassava^{43, 50}, banana⁴⁵, orange-fleshed sweet potato^{48, 49}, corn⁵¹ and carrot⁴⁷. However, as occurred with heat-processing, some studies involving frozen-stored samples did not obtain high bioaccessibility values in sweet potato⁴², salad^{38, 40}, sorghum⁵² or orange-fleshed sweet potato⁴¹. Although, frozen storage of samples is useful because it facilitates laboratory analysis of numerous samples, standardizing sample collection procedures, etc., it is not useful from the nutritional point of view in fruits, as the circumstances in which they are consumed after freezing are limited.

Finally, the addition of a fat and/or oil to *in vitro* digestion is critical, as can be observed in studies with and without fat addition^{21, 45, 48}, as the bioaccessibility of β -carotene increased from 0% to 20% when fat was added to the digestion process⁴⁰. Fat produces a lipophilic environment that facilitates the transfer of the carotenoids from the food matrix to lipid droplets during the gastric phase. Moreover, the products of lipid hydrolysis modify the physicochemical characteristics of the micelles, a circumstance that may increase the their uptake of carotenoids. It also increased the secretion of pancreatin and of bile salts, although since a static method was used, the amounts of enzymes were predetermined in the method³⁸. The addition of fat may be the reason for increased bioaccessibility in studies involving watermelon, to which full-fat yogurt was added³³, cassava⁴³, banana⁴⁵, orange-fleshed sweet potato⁴⁹ and carrot⁴⁷, although, as was pointed out above with respect to heat and freezing, there are exceptions, and low bioaccessibility has also been reported for foods with added fat: sweet potato^{41, 42}, sorghum⁵² and salad³⁹. Fruit is not often consumed together with a source of fat, as this combination is not a common culinary offering. However, fruit is often eaten for dessert after a meal that contains fat, a practice that should have a positive effect on bioaccessibility.⁵³

B) Analytical method: On comparing *in vitro* digestion methods, the lack of homogeneity among them is striking, and applies to differences not only between digestion protocols, but between ways of expressing the results, as well. The main aspects to be considered in the protocol are the phases of digestion to be simulated, their duration, pH, and number and amounts of enzymes added. As can be seen in Table 2, one of these protocols omits the oral phase⁵⁴, but all of them include the two main phases, gastric and duodenal, and the studies in which they are employed differ little in terms of pH (pH 1 - 2.5) and duration (1-2 h), with the

ARTICLE

Journal Name

exception of those following the protocol proposed by Reboul⁴⁵ and the

Please do not adjust margins



Journal Name

ARTICLE

Table 2. Content, bioaccessibility and protocol reported in the cited studies performed in individual foods (with the exception of fat addition) in which the results are expressed as percentages of the total content in the food

			DIFFERENCES IN PROTOCOL							DIFFERENCES IN HANDLING				
Food	Content in food (µg/100 g)	Bioaccessibility	Duration and pH	Enzymes						Frozen	Heated	Fat added	Protocol based on	Ref.
				AA	Pe.	Pa.	BS	CE	Li.					
Baby leaf salad	Graph difficult to understand	β-Car 22.0%	OP:15min; GP:1h-pH1; DP:2h-pH7.8	<	<	<	<	-	used	NS	no	no	Oomen, et al., 2003	46
Banana	α-Car 6-440 β-Car 7-862	α-Car 14.0-41.0% β-Car 10.2-32.0%	OP:10min; GP:0.5h-pH4; DP: 0.5h-pH6	=	>	<	<	-	-	yes	yes	yes	Reboul, et al., 2006	45
Broccoli	β-Car 794	β-Car 21.6%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	no	yes	no	Oomen, et al., 2003	5
Broccoli	β-Car 812	β-Car 18%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	no	yes	no	Oomen, et al., 2003	37
Carrot	Graph difficult to understand	α-Car 25.0% β-Car 12.0%	OP:15min; GP:1h-pH1; DP:2h-pH7.8	<	<	<	<	-	used	NS	no	no	Oomen, et al., 2003	46
Carrot	α-Car 2280 β-Car 3870	α-Car 38.0% β-Car 37.0%	GP:0.5h-pH4 & 0.5h-pH2; DP:2h-pH6.9	-	>	<	<	-	-	yes	yes	yes	Garrett et al., 1999	47
Carrot	α-Car 1294 β-Car 3230	α-Car 72.0% β-Car 76.5%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	no	yes	no	Oomen, et al., 2003	5
Cassava	β-Car 23-899	β-Car 9.0-50.0%	OP:10min; GP:1h-pH2; DP:2h-pH7.5	>	<	<ó = ‡	<	-	used	yes	yes	yes	Thakkar et al., 2007	43
Cassava	β-Car 0-700	β-Car 12.0-30.0%	OP:10min; GP:1h-pH 2.5; DP:2h-pH6.5	>	>	<	=	-	used	yes	yes	no	Thakkar et al., 2007	44

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

ARTICLE				Journal Name										
Green jalapeño pepper	β-Car 310 α-Car 20	β-Car 28.5%	GP:1h-pH2; DP: 2h-pH7	-	>	=	>	-	used	no	no	no	Garrett et al., 1999	23
Kiwi	β-Car 31	β-Car 56.9%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	no	no	no	Oomen, et al., 2003	5
Lettuce	β-Car 96	β-Car 51.0%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	no	no	no	Oomen, et al., 2003	5
Loquat	β-CX 469 β-Car 222	β-CX 9.6% β-Car 17.6%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	NS	NS	no	Oomen, et al., 2003	5
Maize flour and porridge	(maize flour) β-CX ND-280 β-Car 4-900	(Maize porridge) β-CX 28.0-30.0% β-Car 16.7%	OP:10 min; GP:1h-pH2.5; DP:2h-pH6.5	>	>	<	=	NS	used	yes	yes	no	Thakkar et al., 2007	50
Mandarin	β-CX 378	β-CX 20.4%	GP:2h-pH2; DP:2h-pH6.9	-	>	>	=	-	-	yes	no	no	Cilla et al., 2012	32
Mango (different ripening stages)	β-CX 10-30 β-Car 1070-3940	β-Car 4.5-7.0%	GP:1h-pH3; DP:2h-pH7	-	>	=	>	-	-	no	no	no	Garrett et al., 1999	53
Orange	β-CX 0	β-CX 42.3%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	no	no	no	Oomen, et al., 2003	5
Orange (Cara Cara)	β-CX 21 β-Car 17	β-CX 9.7% β-Car 5.9%	GP:2h-pH2; DP:2h-pH6.9	-	>	>	=	-	-	yes	no	no	Cilla et al., 2012	32
Orange (Navel)	β-CX 57	β-CX 7.1%	GP:2h-pH2; DP:2h-pH6.9	-	>	>	=	-	-	yes	no	no	Cilla et al., 2012	32
Orange pepper	Graph difficult to understand	β-Car 57.0%	OP:15min; GP:1h-pH1; DP:2h-pH7.8	<	<	<	<	-	used	NS	no	no	Oomen, et al., 2003	46
Orange-fleshed sweet potato	β-Car 5706-9294	β-Car 23.7-40.8%	OP:15min-pH6.7; GP:0.5h-pH4 & 0.5h-pH2; DP:2h-pH6.9	>	>	<	=	-	-	yes	yes	no	Hedren et al, 2002.	48
Orange-fleshed sweet potato	β-Car 17890-23290 (dry weight)	β-Car 28.8-76.0%	OP:15min-pH6.7; GP:0.5h-pH4 & 0.5h-pH2; DP:2h-pH6.9	>	>	<	=	-	-	yes	yes	yes	Hedren et al, 2002.	49

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

Journal Name

ARTICLE

Orange-fleshed sweet potato	β -Car 11210-28080	β -Car 0.6-3.0%	OP:10min; GP:1h-pH2.5; DP:2h-pH6.5	>	<	=	>	NS	used	yes	yes	yes	Thakkar et al., 2007	41
Orange-fleshed sweet potato (3 varieties)	α -Car 0-27 β -Car 1-11440	α -Car ND β -Car 4.3-8.0%	OP:10min; GP:1h-pH2.5; DP:2h-pH6.5	- §	> §	< §	< §	-	-	yes	yes	yes	Thakkar et al., 2007	42
Pineapple	β -CX 26 β -Car 6	β -CX 46.2% β -Car 98.7%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	no	no	no	Oomen, et al., 2003	5
Red jalapeño pepper	β -CX 280 β -Car 2110	β -CX 44.5% β -Car 7.2%	GP:1h-pH2; DP: 2h-pH7	-	>	=	>	-	used	no	no	no	Garrett et al., 1999	23
Red pepper	Graph difficult to understand	α -Car 27.0% β -Car 30.0%	OP:15min; GP:1h-pH1; DP:2h-pH7.8	<	<	<	<	-	used	NS	no	no	Oomen, et al., 2003	46
Red pepper	β -CX 314 β -Car 618	β -CX 98.1% β -Car 70.6%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	NS	NS	no	Oomen, et al., 2003	5
Red pepper (17 different genotypes from 3 species)	β -CX 1295-17327 β -Car 568-5749	β -CX 2.4-16.5% β -Car 0.4-13.1%	GP:1h-pH2; DP:2.5h-pH7.4	NS	NS	NS	§§	NS	-	no	no	no	Garrett et al., 1999	21
Red pepper (bell pepper)	β -CX 2484 β -Car 5635	β -CX 6.2% β -Car 33.1%	GP:1h-pH2; DP:2.5h-pH7.4	-	>	>	§§	-	-	no	no	no	Garrett et al., 1999	22
Rocket	Graph difficult to understand	β -Car 14.0%	OP:15min; GP:1h-pH1; DP:2h-pH7.8	<	<	<	<	-	used	NS	no	no	Oomen, et al., 2003	46
Salad	α -Car 1650 β -Car 3250	α -Car 1.4% β -Car 0.0%	GP:1h-pH2; DP:2h-pH7.5	-	>	>	>	-	-	yes	no	no	Garrett et al., 1999	40
Salad	NS	α -Car 12.0-14.0% β -Car 8.0-11.0%	OP:10min; GP:1h-pH2.5; DP:2h-pH6.5	>	>	<	=	-	used	NS	no	yes	Thakkar et al., 2007	39
Salad	α -Car 1170 β -Car 3830	α -Car 2.0% β -Car 2.8%	GP:1h-pH3; DP: 2h-pH7	-	>	<	=	-	used	yes	no	no	Garrett et al., 1999	38
Sorghum	β -CX 5-45 α -Car 4-75 β -Car 70-1070	β -Car 2.0-8.2%	OP:10min; GP:1h-pH2.5; DP:2h-pH6.5	>	<	<	<	-	used	yes	yes	yes	Kean, et al., 2011	52

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

ARTICLE

Journal Name

Spinach	Graph difficult to understand	β -Car 12.0%	OP:15min; GP:1h-pH1; DP:2h-pH7.8	<	<	<	<	-	used	NS	no	no	Oomen, et al., 2003	46
Spinach	β -Car 662	β -Car 25.5%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2 h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	yes	yes	no	Oomen, et al., 2003	5
Tomato	β -Car 140	β -Car 62.0%	GP:0.5h-pH4 & 0.5h-pH2; DP:2h-pH6.9	-	>	<	<	-	-	yes	yes	yes	Garrett et al., 1999	47
Tomato paste	Composition includes raw tomato	β -Car 100.0%	OP:5min; GP:1h-pH1.1; DP:2h-pH7.8	>	>	>	>	<	-	NS	NS	no	Oomen, et al., 2003	5
Watermelon	β -Car 109	β -Car 30.2%	GP:1h-pH2; DP:2h-pH6.9	-	=	<	§§	-	used	no	no	yes	Garrett et al., 1999	33
Wild garlic	Graph difficult to understand	β -Car 21.0%	OP:15min; GP:1h-pH1; DP:2h-pH7.8	<	<	<	<	-	used	NS	no	no	Oomen, et al., 2003	46
Yellow pepper	Graph difficult to understand	α -Car 45.0% β -Car 36.0%	OP:15min; GP:1h-pH1; DP:2h-pH7.8	<	<	<	<	-	used	NS	no	no	Oomen, et al., 2003	46

AA+A1:O47= α -amylase, Pe.= Pepsine, Pa.= Pancreatine; BS= Bile Salts, CE= cholesterol esterase, Li.= Lipase, β -CX= β -Cryptoxanthin, β -Car= β -Carotene, α -Car= α -Carotene, OP=Oral phase, DP= Duodenal Phase, NS= Not specified, ND=Not determined.
‡Depending on if they use 0.3 or 1.5g of simple; § Amount of sample not indicated; §§ Individual bile salts.

Please do not adjust margins



Journal Name

ARTICLE

combination of those of Garrett and Hedrén⁴⁹. The widest variability is observed in the amounts of enzymes added, as there are nearly no coincidences across studies, there being cases in which the amount was 200-fold higher²² or lower⁴³. Table 2 indicates whether the amount of each enzyme in proportion to the grams of sample was higher, lower or equal to that used in the present study; however, it should be kept in mind that in the protocol we followed, the enzymes were added depending to their activity, rather than simply according to weight. When we compared our results with those of other studies in which the durations, pH and concentrations were similar or different, we found similarities and differences. However, exactly the same method used in this study was applied in a previous study by our group (with the only modification of not applying cholesterol esterase because no xanthophyll was present), for assessing the bioaccessibility of β -carotene from sweet potato flower both raw and subjected to two different heat treatments, and bioaccessibility percentages ranged from 15.1% to 42.8%. Maybe the fact of start off from a sample previously dried, grinded up and frozen, increased the bioaccessibility in addition to the effect of heat treatments in those samples in which they were applied.⁵⁵

The results of the studies on bioaccessibility carried out to date differ widely due to differences in the food matrix, in food handling (freezing, cooking, fat addition) and/or in the *in vitro* digestion model. Thus, the analysis of carotenoids calls for the design and widespread use of a standardized method of *in vitro* digestion to limit the number of variables that influence the disparity among the findings. It is important not only to standardize the protocol, but to provide complete information on the food analyzed (variety, ripening stage, plant parts, etc.) and on its prior handling (processing times and temperatures, freezing, etc.).

Finally, we must stress the importance of expressing the results in such a way as to enable their comparison across studies, as the differences in their presentation sometimes make this impossible. For example, in some studies, they are expressed as content in the supernatant³² and, in others, as content in the micellar phase³⁹, whereas other authors report measurements in the duodenal phase without specifying whether before or after centrifugation¹⁴. In other reports, the amounts present in the micellar phase or in the supernatant are expressed as a percentage of a total; in the majority of cases, this total is the content in the food, but in others, it is the content at the end of the duodenal phase, and in still others, it is the supernatant, and the results are expressed as the percentage transferred from these phases to the micelles⁵⁶. When the study involves xanthophylls, there is another especially relevant datum—whether or not the initial or final samples were subjected to saponification—that is not always expressly indicated.

Conclusions

In spite of the numerous variables that influence bioaccessibility and the extremely wide discrepancies in the reported data, the

bioaccessibility found in this study and in many others is surprisingly low. With this level of availability, it seems difficult to explain the serum concentrations of these compounds reached in food dietary intervention studies^{7, 57}. On the other hand, these data question the lesser contribution to vitamin A intake attributed to β -cryptoxanthin, and are supported by those from another report^{1, 38}, in which its bioaccessibility was higher than that of β -carotene in nearly half of the fruits analyzed.

Our findings argue in favor of using standardized and validated procedures in the analysis of the bioaccessibility of provitamin A carotenoids. This would enable the proper assessment of the intake of vitamin A, which could serve as an aid in public health interventions and possibly in the development of functional foods targeting individuals with low vitamin A intake, but might also be useful in the context of new roles for these compounds (i.e. β -cryptoxanthin in relation to bone health).

Acknowledgements

Rocío Estévez-Santiago is the recipient of a JAE-Predoc grant from the Spanish Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), awarded under the program of the Junta para la Ampliación de Estudios, cofinanced by the European Social Fund (ESF). The support of the program for international connection iLINK+ (I-LINK0770) of the CSIC and the AZ Mercadante's critical contribution (Sao Paulo Research Foundation (FAPESP, proc. 13/50789-0)) are acknowledged.

1. B. J. Burri, *J. Sci. Food Agric.*, 2015, **95**, 1786-1794.
2. G. Maiani, M. J. Periago Caston, G. Catasta, E. Toti, I. Goni Cambrodon, A. Bysted, F. Granado-Lorencio, B. Olmedilla-Alonso, P. Knuthsen, M. Valoti, V. Boehm, E. Mayer-Miebach, D. Behnlian and U. Schlemmer, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009, **53**, S194-S218.
3. N. Efsa Panel on Dietetic Products and Allergies, *EFSA Journal*, 2015, **13**, 4028 [4084pp.]-4028 [4084pp.].
4. P. J. Aggett, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, **91**, 1433S-1437S.
5. F. Granado-Lorencio, B. Olmedilla-Alonso, C. Herrero-Barbudo, B. Perez-Sacristan, I. Blanco-Navarro and S. Blazquez-Garcia, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 6387-6394.
6. *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc.*, National Academy Press, Washington, DC, 2000.
7. S. d. Pee, C. E. West, D. Permaesih, Martuti, Muhilal and J. G. A. J. Hautvast, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, **68**, 1058-1067.
8. C. L. Rock, *Pharmacol. Ther.*, 1997, **75**, 185-197.
9. L. Lemmens, I. Colle, S. Van Buggenhout, P. Palmero, A. Van Loey and M. Hendrickx, *Trends Food Sci. Technol.*, 2014, **38**, 125-135.

10. C. E. West and J. Castenmiller, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1998, **68**, 371-377.
11. M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and A. Brodkorb, *Food Funct.*, 2014, **5**, 1113-1124.
12. B. Beltran-de-Miguel, R. Estevez-Santiago and B. Olmedilla-Alonso, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2015, **66**, 706-712.
13. B. Beltrán, R. Estévez, C. Cuadrado, S. Jiménez and B. Olmedilla Alonso, *Nutr Hosp.*, 2012, **27**, 1334-1343.
14. F. Granado-Lorencio, B. Olmedilla-Alonso, C. Herrero-Barbudo, I. Blanco-Navarro, B. Perez-Sacristan and S. Blaquez-Garcia, *Food Chem.*, 2007, **102**, 641-648.
15. M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and A. Brodkorb, A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. Supplementary Material: Protocol for enzyme assays., <http://www.rsc.org/suppdata/fo/c3/c3fo60702j/c3fo60702j1.pdf>, DOI: 10.1039/c3fo60702j).
16. Assay Procedure for Cholesterol Esterase, <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/assay-procedure-for-cholesterol-esterase.html>, (2015).
17. V. V. d. Rosso and A. Z. Mercadante, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 5062-5072.
18. F. Granado, B. Olmedilla and I. Blanco, *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 2001, **2**, 151-158.
19. M. I. Minguezmosquera and D. Horneromendez, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 1616-1620.
20. F. Granado, B. Olmedilla, I. Blanco and E. Rojas Hidalgo, *J. Agr Food Chem*, 1992, **40**, 2135-2140.
21. A. Pugliese, Y. O'Callaghan, R. Tundis, K. Galvin, F. Menichini, N. O'Brien and M. R. Loizzo, *Plant Foods Hum. Nutr. (N. Y., NY, U. S.)*, 2014, **69**, 8-17.
22. L. O'Sullivan, K. Galvin, S. A. Aherne and N. M. O'Brien, *Food Res. Int.*, 2010, **43**, 1130-1135.
23. C. I. Victoria-Campos, J. de Jesus Ornelas-Paz, E. M. Yahia and M. L. Failla, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 3642-3653.
24. P. C. Cardoso, A. P. B. Tomazini, P. C. Stringheta, S. M. R. Ribeiro and H. M. Pinheiro-Sant'Ana, *Food Chem.*, 2011, **126**, 411-416.
25. Z. Chunhua, Z. Daqiu, S. Yanle, T. Jun and Y. Yong, *Molecules*, 2011, **16**, 624-636.
26. R. Monge-Rojas and H. Campos, *J. Food Compos. Anal.*, 2011, **24**, 202-216.
27. M. G. Dias, M. F. G. F. C. Camoes and L. Oliveira, *Food Chem.*, 2009, **113**, 808-815.
28. B. Olmedilla, F. Granado and E. Rojas-Hidalgo, in *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*, 1993, pp. 141-145.
29. B. Olmedilla, F. Granado, I. Blanco and E. Gil-Martínez, *Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.*, 1998, **2**, 57-70.
30. B. Escudero-Lopez, I. Cerrillo, G. Herrero-Martin, D. Hornero-Mendez, A. Gil-Izquierdo, S. Medina, F. Ferreres, G. Berna, F. Martin and M.-S. Fernandez-Pachon, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 8773-8782.
31. M. G. Dias, M. F. G. F. C. Camoes and L. Oliveira, *Food Chem.*, 2008, **109**, 815-824.
32. M. J. Rodrigo, A. Cilla, R. Barbera and L. Zacarias, *Food Funct.*, 2015, **6**, 1950-1959.
33. J. L. Jeffery, N. D. Turner and S. R. King, *J. Sci. Food Agric.*, 2012, **92**, 2603-2610.
34. B. Setiawan, A. Sulaeman, D. W. Giraud and J. A. Driskell, *J. Food Compos. Anal.*, 2001, **14**, 169-176.
35. A. F. de Faria, P. N. Hasegawa, E. A. Chagas, R. Pio, E. Purgatto and A. Z. Mercadante, *J. Food Compos. Anal.*, 2009, **22**, 196-203.
36. D. B. Rodriguez-Amaya, *J. Food Compos. Anal.*, 2010, **23**, 726-740.
37. F. Granado, B. Olmedilla, C. Herrero, B. Perez-Sacristan, I. Blanco and S. Blaquez, *Exp. Biol. Med.*, 2006, **231**, 1733-1738.
38. T. Huo, M. G. Ferruzzi, S. J. Schwartz and M. L. Failla, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 8950-8957.
39. M. L. Failla, T. Huo and S. K. Thakkar, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2008, **17**, 200-203.
40. M. L. Failla, C. Chitchumronchokchai, M. G. Ferruzzi, S. R. Goltz and W. W. Campbell, *Food Funct.*, 2014, **5**, 1101-1112.
41. M. L. Failla, S. K. Thakkar and J. Y. Kim, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 10922-10927.
42. P. Berni, C. Chitchumroonchokchai, S. G. Canniatti-Brazaca, F. F. De Moura and M. L. Failla, *Plant Foods Hum. Nutr. (N. Y., NY, U. S.)*, 2015, **70**, 1-8.
43. P. Berni, C. Chitchumroonchokchai, S. G. Canniatti-Brazaca, F. F. De Moura and M. L. Failla, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 6677-6686.
44. S. K. Thakkar, B. Maziya-Dixon, A. G. O. Dixon and M. L. Failla, *Journal of Nutrition*, 2007, **137**, 2229-2233.
45. B. Ekesa, M. Poulaert, M. W. Davey, J. Kimiywe, I. Van den Bergh, G. Blomme and C. Dhuique-Mayer, *Food Chem.*, 2012, **133**, 1471-1477.
46. C. Reif, E. Arrigoni, D. Baumgartner, H. Schaerer, A. B. Nising and R. F. Hurrell, in *III International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables - Favhealth 2009*, eds. B. Patil, O. VanKooten and M. J. AmiotCarlin, 2014, vol. 1040.
47. C. A. Svelander, P. Lopez-Sanchez, P. D. A. Pudney, S. Schumm and M. A. G. Alminger, *Journal of Food Science*, 2011, **76**, H215-H225.
48. A. Bengtsson, M. L. Alminger and U. Svanberg, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 9693-9698.
49. A. Bengtsson, C. Brackmann, A. Enejder, M. L. Alminger and U. Svanberg, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 11090-11096.
50. S. K. Thakkar and M. L. Failla, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 11441-11446.
51. S. K. Thakkar, T. Huo, B. Maziya-Dixon and M. L. Failla, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 1344-1348.
52. T. E. Lipkie, F. F. De Moura, Z.-Y. Zhao, M. C. Albertsen, P. Che, K. Glassman and M. G. Ferruzzi, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 5764-5771.

Journal Name

ARTICLE

53. J. D. J. Ornelas-Paz, M. L. Failla, E. M. Yahia and A. Gardea-Bejar, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 1511-1516.
54. D. A. Garrett, M. L. Failla and R. J. Sarama, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4301-4309.
55. R. Estévez-Santiago, N. Trancoso-Reyes, L. A. Ochoa-Martínez, I. Fernández-Jalao and B. Olmedilla-Alonso, *XVII Congreso Latinoamericano de Nutrición (SLAN)*. 2015.
56. O. F. O'Connell, L. Ryan and N. M. O'Brien, *Nutr. Res.*, 2007, **27**, 258-264.
57. B. J. Burri, J. S. Chang and T. R. Neidlinger *Brit J Nutr*, 2011, **105**, 212-219.

Capítulo 2: Efecto de la ingesta de carotenoides sobre la salud.

1. Relationship between macular pigment optical density and contrast sensitivity in two age groups and the influence of dietary and biochemical markers of lutein and zeaxanthin. *Nutrition Research* (Enviado 8 de Octubre de 2015. Manuscript ID: NR-15-633).
2. The importance of the food source and its color in the relationship between lutein and zeaxanthin intake from fruit, vegetable and eggs and their associations with nutritional status and the macular pigment optical density in Spanish subjects. *British Journal of Nutrition* (Enviado 21 de Julio de 2015, en Revisión. Manuscript ID: BJN-RA-15-0791)
3. Assessment of dietary vitamin A intake (retinol, α -carotene , β -carotene, β -cryptoxanthin) and its sources in the National Survey of Dietary Intake in Spain (2009–2010). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2015; 66(6):706-712.
4. Assessment of dietary lutein, zeaxanthin and lycopene intakes and their sources in the National Survey of Dietary Intake in Spain (2009-2010). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (Enviado 31 de Octubre de 2015. Manuscript ID: CIJF-2015-1023).

Relationship between macular pigment optical density and contrast sensitivity in two age groups and the influence of dietary and biochemical markers of lutein and zeaxanthin.

Rocío Estévez-Santiago¹; Begoña Olmedilla-Alonso^{1*}; Beatriz Beltrán-de-Miguel²

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) (Madrid, Spain).

² Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain).

*Corresponding author:

Begoña Olmedilla-Alonso. Department of Metabolism and Nutrition, ICTAN-CSIC.

José Antonio Novais 10, 28040 Madrid

Tel: (+34) 91 549 2300 Fax: (+34) 91 549 3627

BOLmedilla@ictan.csic.es.

Abbreviations

AMD, age-related macular degeneration; BMI, body mass index; CI, confidence interval; CS, contrast sensitivity; CT, contrast threshold; F+V, fruit and vegetable; GLM, generalized linear models; HDL, high-density lipoprotein cholesterol; HPLC, high performance liquid chromatography; MP, macular pigment; MPOD, macular pigment optical density; LDL, low-density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides.

Abstract

Objective: to assess the relationship between macular pigment optical density (MPOD) and contrast sensitivity (CS), with and without glare, in two age groups of healthy Spanish subjects, considering the influence of serum lutein and zeaxanthin and, the fruit and vegetable intake (F+V).

Subjects and methods: 108 volunteers (54 men), divided into two age groups (20-35y and 45-65y) enrolled in a cross-sectional study. MPOD and lutein and zeaxanthin concentrations in serum and dietary intake were determined using heterochromatic flicker photometry, HPLC and 3-day food records, respectively. CS was measured with the CGT-1000 Contrast Glaretester at six stimulus sizes, with and without glare. Spearman correlation coefficient and a general linear model were used for the statistical study.

Results: MPOD and CS were higher in younger individuals ($p < 0.000$) and were correlated only in the older group. The coefficients of the contrast threshold (CT) were higher in the older (0.635-0.904; $p < 0.000$) than in the younger group (0.251-0.696; $p < 0.001$). CTs were higher under glare conditions, at the intermediate and smaller visual angles, with greater differences in the older ($p < 0.003$) than in the younger group ($p < 0.014$). F+V intake correlated with CS (< 0.01) in the total sample. MPOD and serum lutein were identified as predictors for CS in the older subjects, and F+V (each 100g/d) in the younger group.

Conclusions: CS showed age-specific predictors: MPOD and serum lutein in the older group (45-65y), which would be the target population for an improvement in vision quality through dietary means, and F+V intake in the younger group.

Key words: macular pigment, contrast sensitivity, lutein, zeaxanthin, fruit and vegetable, age groups.

1. Introduction

The macula is located roughly in the center of the retina and is responsible for detailed central vision. The yellow coloration of the macula is due to the presence of the macular pigment (MP) in the axons of its photoreceptors [1] which is composed of lutein, zeaxanthin, major carotenoids in the human diet (mainly from fruits and vegetables), and meso-zeaxanthin that is obtained from the dietary lutein in the retina and, in small amounts, from the diet [2]. These carotenoids are found at the macula in higher concentrations than anywhere else in the body. There they can act as antioxidants to protect the eyes from oxidative stresses and as blue light filters [3] [4]. The MP can be measured by a number of techniques, the most widely used noninvasive test being heterochromatic flicker photometry [5]. On the other hand, there is growing evidence suggesting that some food components can attenuate the risk and / or progression of age-related macular degeneration (AMD), a major cause of blindness in the elderly population in the developed world, and lutein and zeaxanthin are among those components [4].

Numerous studies have measured the MP because incrementing its density has been related to improved visual function [4, 6, 7] and low MP levels are considered a modifiable risk factor for AMD. MP optimizes visual performance in non-diseased eyes because of its pre-receptoral absorption of blue light and consequential attenuation of the effects of chromatic aberration and the adverse effect of light scatter [8, 9]. The evidence that the MP carotenoids could improve visual performance is supported by different types of studies, such as those assessing the effect of lutein supplementation on visual performance in patients with cataracts [10] or early stage AMD [7, 11] and in controls [12], which reported an improvement in visual acuity and a reduction of glare sensitivity. These functional improvements were consistent with measured increases in MP density [11], although a

relationship between MP and visual acuity was not always found and there were controversial results depending, mainly, on the stimulus conditions used [13-16] and the ways in which visual function was assessed. In this regard, contrast sensitivity (CS), a measure of the ability of the visual system to distinguish objects of dissimilar luminance, is considered to better reflect overall visual performance than does visual acuity [9].

Although most of the increasing number of observational and interventional studies designed to assess the relationship between macular pigment optical density (MPOD) and visual performance show a significant relationship between variation in MPOD and immediate effects on visual function [17], the cause and effect relationship between the lutein and zeaxanthin intake and the maintenance of normal vision has not been established. While it is widely accepted that lutein can increase MPOD in most, but not all, healthy subjects, it has not been established that said increase in MP density be related to vision [18, 19], or that the consumption of a combination of lutein and zeaxanthin be related to improved vision under bright light conditions [20]. Thus, more studies are needed to examine the relationship between MPOD and visual function in well-characterized groups of individuals and using comparable methodologies.

The aim of this study was to assess the relationship between MPOD and CS, with and without glare, as a measurement of visual function/ performance, in a group of healthy Spanish subjects, considering the influence of biochemical and dietary variables that correlate with MPOD in these individuals, as previously reported [21]: age, gender, serum concentration of lutein and of lutein plus zeaxanthin / cholesterol plus triglycerides, and the fruit and vegetables intake.

2. Subjects and methods

2.1. Subjects and study design

108 volunteers (54 men), divided into two age groups (20- 35 y and 45- 65 y) (mean \pm SD: 25.6 \pm 3.2 y and 52.4 \pm 5.2 y, respectively) were enrolled in a cross-sectional study over the course of an entire year, and underwent blood sampling, assessment of MPOD and CS (with and without glare) and three 24-hour records. The recruitment and selection process, lutein and zeaxanthin serum concentrations and MPOD are described elsewhere [21]. The age groups were established because of their different dietary habits and risk of age-related ocular disease. Briefly, the inclusion criteria were normal cholesterolemia, body mass index (BMI) under 30 kg/m² and mixed diet. Volunteers were asked to report information on the following exclusion criteria: consumption of dietary supplements, BMI under 20 kg/m², surgery for myopia (within the previous year), cataracts or AMD, use of drugs or phytosterol-enriched beverages/foods to control cholesterol level, regular consumption of n-3 fatty acid-enriched food products and chronic diseases that can affect carotenoid or lipid metabolism (i.e. diabetes, cardiovascular disease).

This study was conducted in accordance with the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda of Madrid, Spain (registry no. 257, dated 19 July 2010). Written informed consent was obtained from all subjects.

2.2. Macular pigment optical density (MPOD) assessment

MPOD was assessed using an MPS 9000 desktop device (Macular Pigment Screener, Elektron PLC, Cambridge, UK) that applies the principles of heterochromatic flicker

photometry. The technique and reliability of this device are described in detail by van der Veen et al. [22]. The test consisted of two stages for central and peripheral viewing, and the participants were required to press a response button as soon as they detected flicker. The subjects started by fixating the central stimulus, a 1-degree central target (flicker rate was initially set at 60 Hz and then gradually reduced at a rate of 6 Hz s⁻¹). The process was repeated for a series of green-blue luminance ratios. The observer then fixated a red 2°-diameter target placed 8° eccentrically and a second set of data were recorded for peripheral viewing [23]. The MPOD was measured in density units (du) and ranged from 0 to 1.

2.3. Contrast sensitivity

CS was measured with the CGT-1000 Contrast Glaretester (Takagi, Japan), which determined the contrast threshold (CT) by means of an automated strategy, set for 6 sizes of annular stimuli with diameters ranging from 6.3 to 0.7 degrees of visual angle, with and without glare light conditions. There were 12 levels of CT, ranging from 0.01 to 0.45.

The luminance of the background on which the stimulus was presented was 10 cd/m². The test time for each eye was very short, approximately 2 minutes, which avoided tiring the participants. The specifications selected for the presentation of the stimulus were: presentation duration, 0.2 s; presentation interval, 2 s; test luminance with glare, 40,000 cd/m²; test distance, 350 mm. The device had 8 glare sources arranged around the stimulus that were activated automatically to assess the CS with a simultaneous glare. The test results were automatically printed out on a single graph that showed the sensitivity functions with and without glare.

2.4. Lutein and zeaxanthin analysis in blood

Lutein and zeaxanthin levels were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the procedure and results have been published elsewhere[21]. Carotenoid extraction was performed on serum samples using a slight modification of a previously published method [24].

2.5. Dietary intake assessment

Three-day food records involving 24-h recalls were used to evaluate the recent dietary intake. The amounts consumed were estimated in units (fruits), portions or household servings [25]. On the basis of this information, we calculated food intake in grams/day, which served as the basis for the determination of the daily lutein and zeaxanthin intake using a database that included HPLC analytical data on the carotenoid content of foods[26], incorporated into a software application for the calculation of dietary intake of individual carotenoids[27]. The procedures and results have been published in detail elsewhere[21].

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as the mean and standard deviation, median and 95% confidence interval (CI). The CS is the inverse of the CT. Correlations among CS and MPOD, fruit and vegetable intake and lutein+zeaxanthin / cholesterol+triglycerides in serum were established using Spearman's rho correlation coefficient.

The statistical models used were generalized linear models (GLM, TWEEDIE distribution and LINK=LOG), with CT (six levels of stimuli, visual angle degrees) as the dependent variable and with fixed factors (sex, age) and covariates (fruit and vegetable intake, lutein and lutein+zeaxanthin / cholesterol+triglycerides in serum and MPOD). The variables

assessed as potential predictors of the CS response were the biochemical parameters (lutein in serum, lutein+zeaxanthin / cholesterol + triglycerides) and sex and age (because they were seen to be predictors of MPOD in these subjects, as well as the fruit plus vegetable intake (because, among the biochemical and dietary variables, it was the variable that showed the highest coefficient correlation ($\rho = 0.350$) with MPOD), as previously reported[21] and MPOD. Interaction was observed for CT (with and without glare), which was influenced by age and sex in the group of older subjects.

All reported *P*-values are based on a two-sided test and compared to a significance level of 5%. SPSS v.23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software was used for all statistical calculations.

3. Results

The CT data (mean \pm SD, median and 95%CI) for 6 different degrees of visual angle, with and without glare, are shown in table 1. The lower the CT, the higher the CS level at which a subject could detect flicker for each spatial frequency. The CT values were higher with glare than without glare at the intermediate and smaller visual angles (2.5, 1.6, 1.0, 0.7 degrees) and the differences were greater in the older ($p < 0.003$) than in the younger group ($p < 0.014$). No significant differences were found at the large stimulus sizes (6.3 and 4.0 degrees), with or without glare, within each age group. The differences in CT between the age groups were significant at any stimulus size, with lower CT in the older *vs* younger group ($p < 0.000$). The CT values, with and without glare, are highly correlated, the correlation coefficients being higher in the older group (between 0.635 and 0.904; $p > 0.000$) than in the younger group (between 0.251 and 0.696; $p < 0.001$). There was an interaction between sex and CS in the older group.

Table 2 shows the MPOD of the volunteers, together with data for dietary variables (fruit and vegetable intake) and biochemical variables (lutein and lutein+zeaxanthin / cholesterol+triglycerides in serum), because of the high correlations showed with the MPOD [21]. The correlations of those variables with the CS at the six visual angles are shown in table 3. The CT correlated significantly with MPOD at any visual angle, with and without glare, in the older but not in the younger group. The fruit and vegetable intake was also highly correlated with the SC at any visual angle, except 6.3 degrees without glare, in the total sample, but not when age groups were considered. Regarding the biochemical parameters, only one significant correlation was found between the SC (6.3 degree) with the lutein+zeaxanthin / cholesterol + triglycerides in serum in the younger group. Fruit and vegetable intake showed correlation with the biochemical marker in both age groups, and with the MPOD only in the older group.

The sequence and correlations between markers of lutein and zeaxanthin (dietary markers: fruit and vegetable intake; status markers: their concentrations in serum [short-term marker] and MPOD [long-term marker]) and CS as the potentially functional effect of lutein and zeaxanthin is summarized in figure 1. The relationship between MPOD and CS, with and without glare, at six levels of stimuli in the two age groups are shown in figure 2. The degree of correlation (R^2) between MPOD and CS is higher without glare than under glare conditions in both age groups, being higher in the older group (2.9- 5.8% and 3.3– 7%, with and without glare, respectively) than in the younger group (0.1– 0.7% and 0.04– 1.3 %, with and without glare, respectively).

Table 4 correspond to the regression model (GELIN) used to evaluate the predictive value of sex, serum lutein concentration, lutein + zeaxanthin/ cholesterol+triglycerides in

serum, fruit and vegetable intake and MPOD for CT at six visual angles of different degrees, with and without glare. Results from the multivariate regression analysis showed different correlations with CT according to the age group.

In the older group, without glare (table 4a), lutein in serum (all the visual angles), MPOD (at medium and smaller angles: 1.6, 1.0, 0.7) and sex (at large and intermediate angles) were the main predictors of CT and with glare (table 4b) the main predictors of CT were the same as in the absence of glare, but MPOD showed significant associations at almost all angles. In the younger group, only fruit and vegetable intake (each 100g/day) was a predictor of CT without glare (at high degrees) and with glare (at high and medium degrees). In the whole sample, only serum lutein and MPOD were predictors of CT, with and without glare, at any stimulus size.

4. Discussion

Lutein and zeaxanthin, constituents of the MP, provide biological benefits in the retina, where they act by attenuating damaging short-wavelength light and have strong antioxidant properties[12]; however, the extent to which those activities are translated into a physiological effect such as the maintenance of vision or reduced vision loss has yet to be clearly defined[19, 20, 23]. The present study focuses on the complete sequence of variables involved in the relationship between MPOD and visual function, the sequence of lutein and zeaxanthin dietary intake, the concentration of these carotenoids in blood, MPOD and, as final outcome, visual function, measured by CS.

The CS in the younger group is higher than in the older group, a finding that agrees with the results of previously published studies that show a decline of CS with age[8]. In our study, CS also differs according to light conditions, being lower under glare conditions, and

these differences, are more marked in the older group. MPOD was also lower in the older than in the younger group[21], as it also declines with age[28] (although some authors have reported no differences[8]. This decline may be attributable to a decrease in the capacity to respond to carotenoid consumption (in general, the intake is higher among older individuals) and, therefore to defective capture of circulating carotenoids by the central retina[29].

MPOD showed significant correlations with CT at any stimulus size, with and without glare, as well as with fruit and vegetable intake (except at 6.3 degrees) in the total sample. However, when we divide the sample according to age, CT, at any stimulus size, with and without glare, was correlated with MPOD only in the older group, in agreement with other studies[6, 8], as well as with lutein and zeaxanthin serum concentration (a short-term biomarker of their status)[30, 31]. In contrast, in the younger group, there were correlations between CT and fruit plus vegetable intake and lutein+zeaxanthin in serum only with the larger visual angles. It is difficult to explain that, whereas CS is correlated with the MPOD of those subjects whose MPOD is lower (older group), who, on the other hand, have higher serum lutein and zeaxanthin concentrations and higher fruit and vegetable intake[21], no correlations were observed in the younger subjects, despite their higher levels of MPOD and higher CS. Fruit and vegetable intake in the overall study sample was highly correlated with CS, and a strong correlation between the intake of those foods (but not dietary lutein and zeaxanthin intake) and MPOD has been reported[21, 32]. This suggests that, although fruit and vegetable intake are good markers of lutein and zeaxanthin intake [33, 34], these foods are important sources of other micronutrients and bioactive compounds that are also beneficial (e.g., fiber and polyunsaturated fatty acid intake are also directly related to MPOD)[32] and may have a role in visual function. In this context, fruit consumption, but not vegetable consumption, has recently been associated with a lower risk of AMD[35]. On the other hand, differences in serum lipid concentrations could be a determining factor in the

relationship between MPOD and CS. MPOD was influenced by serum lutein (younger individuals) and by lutein plus zeaxanthin in relation to circulating lipids (older group) and, although these subjects had serum cholesterol levels within normal range, the older group had higher cholesterol and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol than the younger group[21]. Moreover, potential oxidative modifications of LDL and high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol that affect lipoprotein metabolism[36], and variations in the lipoprotein receptors that could be selective for different ratios of LDL to HDL[37], may have an effect on retinal pigment epithelial cells.

The MP is generally related to improvements in glare disability and visual performance [7, 14, 17], although the relationship between MPOD and visual performance seems to be age-dependent, as different correlations were observed in the two age groups in this study. In healthy young subjects (18-41y), no associations between MP and visual performance were reported[6]. Under glare conditions, better correlations were obtained at lower frequencies (large visual angles of 6.3, 4 and 2.5 degrees) in the older group, whereas weaker correlations were obtained at intermediate and high frequencies. In general, significant correlations between variation in MPOD and immediate effects on visual function[31] have been reported, but as there are no gold standard techniques or test parameters to assess visual performance[6], results from the literature are difficult to compare.

5. Conclusion

MPOD, together with serum lutein, was found to predict CS, with and without glare, in the older group (45-65 y), which would be the target population for an improvement in vision quality through dietary means, given that a higher intake of a variety of fruits and vegetables and / or food supplements have been shown to produce an increase in serum lutein

and in MPOD [11, 38] with no reported adverse effects to date at the concentrations supplied [39, 40]. Whereas fruit and vegetable intake was identified as the only predictor in the younger group. However, future studies are required to better understand why those who could benefit from a higher intake of lutein were the older subjects, who already had higher fruit and vegetable intake and lutein serum concentrations, compared with the younger group.

Acknowledgements

This study was supported by grant from the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica, Spain) (grant no. PS09/00681) and Rocío Estévez-Santiago is the recipient of a JAEPredoc grant from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), awarded under the program of the Junta para la Ampliación de Estudios, co-financed by the European Social Fund. The authors wish to thank Laura Barrios and Belén Garzón from CSIC for their support in the statistical study.

References

- [1] Snodderly DM, Auran JD, Delori FC. The macular pigment. 2. Spatial-distribution in primate retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1984;25:674-85.
- [2] Nolan JM BS, Meagher KA, Howard AN, Kelly D, Thurnham DI. Verification of Meso-Zeaxanthin in Fish. *J Food Process Technol*. 2014;1.
- [3] Junghans A, Sies, H. and Stahl, W. Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Arch Biochem Biophys*. 2001;391:4.
- [4] O'Connell E, Neelam K, Nolan J, Eong K-GA, Beatty S. Macular carotenoids and age-related maculopathy. *Annals Academy of Medicine Singapore*. 2006;35:821-30.
- [5] IJ M. Macular pigment: characteristics and role in the older eye. In: Werner JS CL, editor. *The New Visual Neurosciences*. London: The MIT Press; 2014.

365 [6] Loughman J, Akkali MC, Beatty S, Scanlon G, Davison PA, O'Dwyer V, et al. The
 366 relationship between macular pigment and visual performance. *Vision Research*.
 367 2010;50:1249-56.

368 [7] Puell MC, Palomo-Alvarez C, Barrio AR, Gomez-Sanz FJ, Jesus Perez-Carrasco M.
 369 Relationship between macular pigment and visual acuity in eyes with early age-related
 370 macular degeneration. *Acta Ophthalmologica*. 2013;91:E298-E303.

371 [8] Hammond BR, Wooten BR, Snodderly DM. Preservation of visual sensitivity of older
 372 subjects: Association with macular pigment density. *Investigative Ophthalmology & Visual*
 373 *Science*. 1998;39:397-406.

374 [9] Loskutova E, Nolan J, Howard A, Beatty S. Macular Pigment and Its Contribution to
 375 Vision. *Nutrients*. 2013;5:1962-9.

376 [10] Olmedilla B GF, Blanco I, Vaquero M. . Lutein, but not alpha-tocopherol,
 377 supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: A 2-y
 378 double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition*. 2003;19:4.

379 [11] Richer S, Stiles W, Statkute L, Pulido J, Frankowski J, Rudy D, et al. Double-masked,
 380 placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the
 381 intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein
 382 Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry (St Louis, Mo)*. 2004;75:216-30.

383 [12] Lien EL, Hammond BR. Nutritional influences on visual development and function.
 384 *Progress in Retinal and Eye Research*. 2011;30:188-203.

385 [13] Engles M, Wooten B, Hammond B. Macular pigment: A test of the acuity hypothesis.
 386 *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48:2922-31.

387 [14] Stringham JM, Hammond BR, Jr. The glare hypothesis of macular pigment function.
 388 *Optometry and Vision Science*. 2007;84:859-64.

389 [15] Stringham JM, Hammond BR. Macular pigment and visual performance under glare
 390 conditions. *Optometry and Vision Science*. 2008;85:82-8.

391 [16] Rodriguez-Carmona M, Kvansakul J, Harlow JA, Kopcke W, Schalch W, Barbur JL. The
392 effects of supplementation with lutein and/or zeaxanthin on human macular pigment density
393 and colour vision. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 2006;26:137-47.

394 [17] Hammond BR, Fletcher LM, Roos F, Wittwer J, Schalch W. y A Double-Blind, Placebo-
395 Controlled Study on the Effects of Lutein and Zeaxanthin on Photostress Recovery, Glare
396 Disability, and Chromatic Contrast. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.
397 2014;55:8583-9.

398 [18] Efsa Panel on Dietetic Products N, Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of
399 a health claim related to lutein in combination with zeaxanthin, and maintenance of normal
400 vision (ID 1606) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*.
401 2011;9:2039 [14pp.]- [14pp.].

402 [19] Efsa Panel on Dietetic Products N, Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of
403 health claims related to lutein and maintenance of normal vision (ID 1603, 1604, further
404 assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*.
405 2012;10:2716 [17pp.]- [17pp.].

406 [20] Efsa Panel on Dietetic Products N, Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of
407 a health claim related to a combination of lutein and zeaxanthin and improved vision under
408 bright light conditions pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA*
409 *Journal*. 2014;12:3753 [12pp.]- [12pp.].

410 [21] Olmedilla-Alonso B, Beltran-de-Miguel B, Estevez-Santiago R, Cuadrado-Vives C.
411 Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women: dietary intake,
412 serum concentrations, lipid profile and macular pigment optical density. *Nutrition Journal*.
413 2014;13.

414 [22] van der Veen RLP, Berendschot TTJM, Hendrikse F, Carden D, Makridaki M, Murray
415 IJ. A new desktop instrument for measuring macular pigment optical density based on a novel

416 technique for setting flicker thresholds. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 2009;29:127-
417 37.

418 [23] Makridaki M, Carden D, Murray IJ. Macular pigment measurement in clinics:
419 controlling the effect of the ageing media. *Ophthalmic and Physiological Optics*.
420 2009;29:338-44.

421 [24] Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Blanco-Navarro I, Botella-Romero F, Simal-
422 Anton A. Assessment of carotenoid status and the relation to glycaemic control in type I
423 diabetics: a follow-up study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2006;60:1000-8.

424 [25] Moreiras O CA, Cabrera L, Cuadrado C. *Tablas de Composición de Alimentos.*:
425 Ediciones Pirámide; 2011.

426 [26] Beltran B, Estevez R, Cuadrado C, Jimenez S, Olmedilla Alonso B. Carotenoid data base
427 to assess dietary intake of carotenes, xanthophylls and vitamin A. Its use in a comparative
428 study of vitamin A nutritional status in young adults. *Nutricion Hospitalaria*. 2012;27:1334-
429 43.

430 [27] Estevez-Santiago R, Beltran-de-Miguel B, Cuadrado-Vives C, Olmedilla-Alonso B.
431 Software application for the calculation of dietary intake of individual carotenoids and of its
432 contribution to vitamin A intake. *Nutricion Hospitalaria*. 2013;28:823-9.

433 [28] Berendschot TT, van Norren D. On the age dependency of the macular pigment optical
434 density. *Experimental Eye Research*. 2005;81:602-9.

435 [29] Meagher KA, Thurnham DI, Beatty S, Howard AN, Connolly E, Cummins W, et al.
436 Serum response to supplemental macular carotenoids in subjects with and without age-related
437 macular degeneration. *British Journal of Nutrition*. 2013;110:289-300.

438 [30] Hammond BR, CurranCelentano J, Judd S, Fuld K, Krinsky NI, Wooten BR, et al. Sex
439 differences in macular pigment optical density: Relation to plasma carotenoid concentrations
440 and dietary patterns. *Vision Research*. 1996;36:2001-12.

441 [31] Hammond BR, Jr., Fletcher LM, Elliott JG. Glare Disability, Photostress Recovery, and
 442 Chromatic Contrast: Relation to Macular Pigment and Serum Lutein and Zeaxanthin.
 443 Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2013;54:476-81.

444 [32] Burke JD, Curran-Celentano J, Wenzel AJ. Diet and serum carotenoid concentrations
 445 affect macular pigment optical density in adults 45 years and older. Journal of Nutrition.
 446 2005;135:1208-14.

447 [33] Martini MC, Campbell DR, Gross MD, Grandits GA, Potter JD, Slavin JL. Plasma
 448 carotenoids as biomarkers of vegetable intake- The University of Minnesota cancer
 449 prevention research unit feeding studies. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.
 450 1995;4:491-6.

451 [34] Thurnham DI, Northrop-Clewes CA, Chopra M. Biomarkers of vegetable and fruit
 452 intakes. American Journal of Clinical Nutrition. 1998;68:756-7.

453 [35] Cho EY, Seddon JM, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Prospective study of intake
 454 of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy. Archives
 455 of Ophthalmology. 2004;122:883-92.

456 [36] Du M, Wu M, Fu D, Yang S, Chen J, Wilson K, et al. Effects of modified LDL and HDL
 457 on retinal pigment epithelial cells: a role in diabetic retinopathy? Diabetologia. 2013;56:2318-
 458 28.

459 [37] Fernandez-Garcia E, Carvajal-Lerida I, Jaren-Galan M, Garrido-Fernandez J, Perez-
 460 Galvez A, Hornero-Mendez D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments
 461 to efficient biological activities. Food Research International. 2012;46:438-50.

462 [38] Granado F, Olmedilla B, Blanco I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human
 463 health. British Journal of Nutrition. 2003;90:487-502.

464 [39] Shao A, Hathcock JN. Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene.
 465 Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2006;45:289-98.

466 [40] Ma L, Yan S-F, Huang Y-M, Lu X-R, Qian F, Pang H-L, et al. Effect of Lutein and
467 Zeaxanthin on Macular Pigment and Visual Function in Patients with Early Age-related
468 Macular Degeneration. Ophthalmology. 2012;119:2290-7.

469

470 **Figure Legends**

471

472 **Figure 1.-** Sequence and correlations between dietary and status markers of lutein and
473 zeaxanthin and CS.

474

475 **Figure 2.-** The relationship between MPOD and CS, with and without glare, at six levels of
476 stimuli in the two age groups.

Figure 1.-

Younger subjects

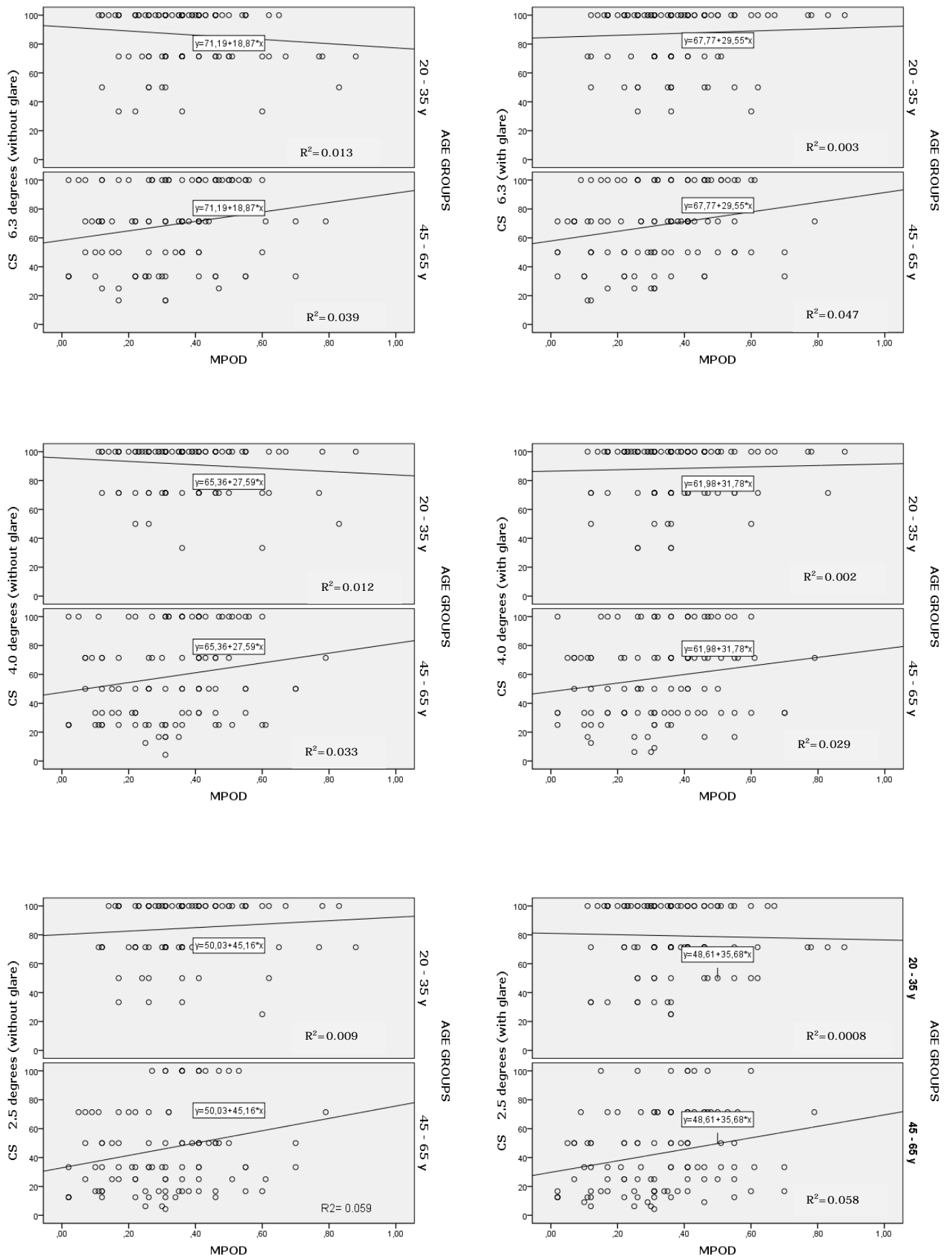
*
*

Older subjects

* Only at higher-degree visual angles

Curves show significant correlations in the younger group (solid curves) and older group (striped curves).

Figure 2.



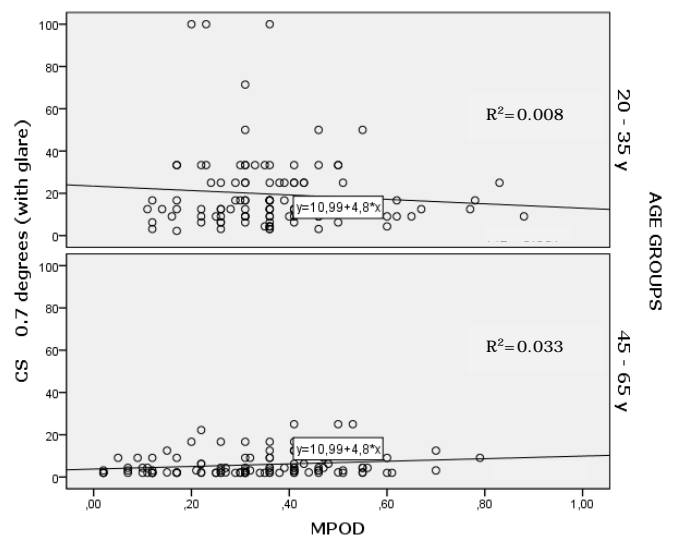
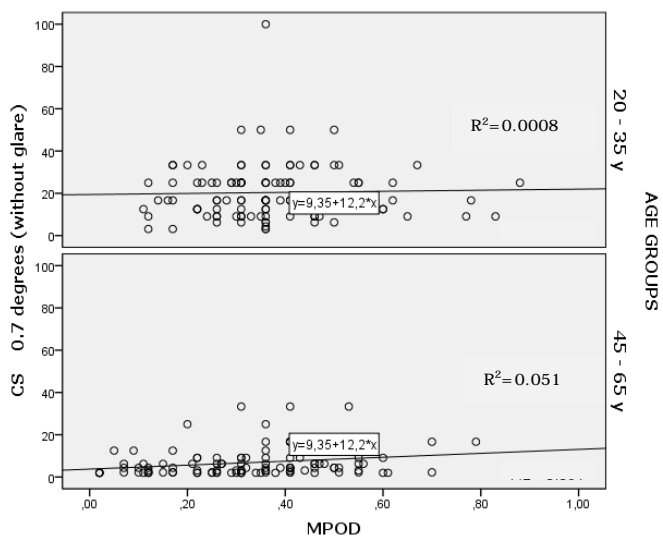
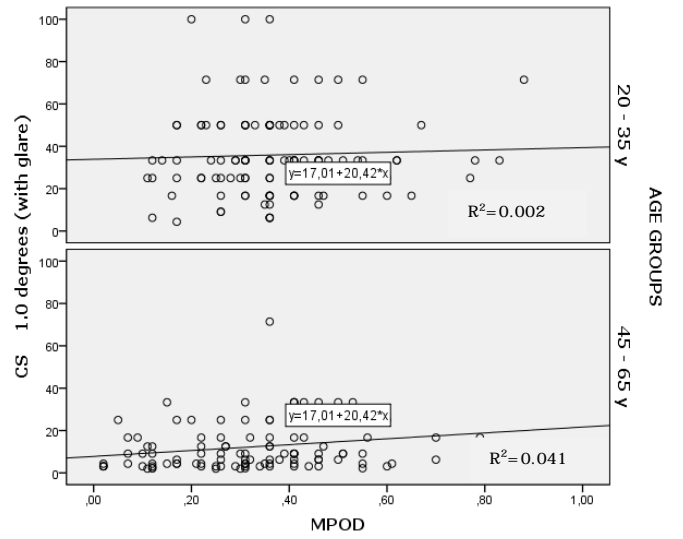
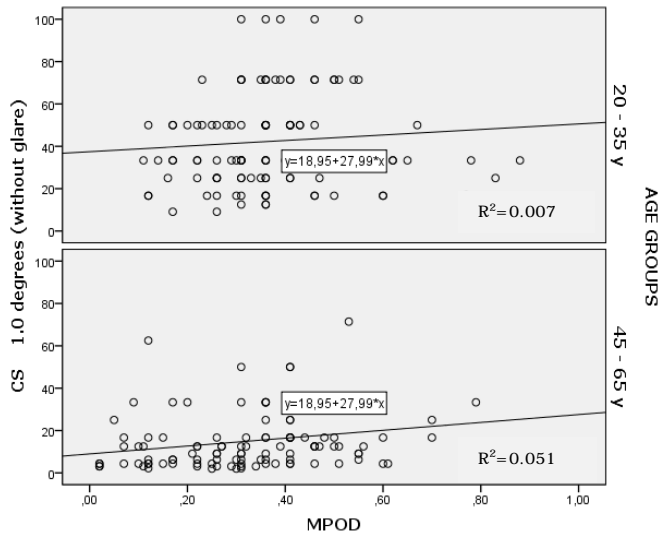
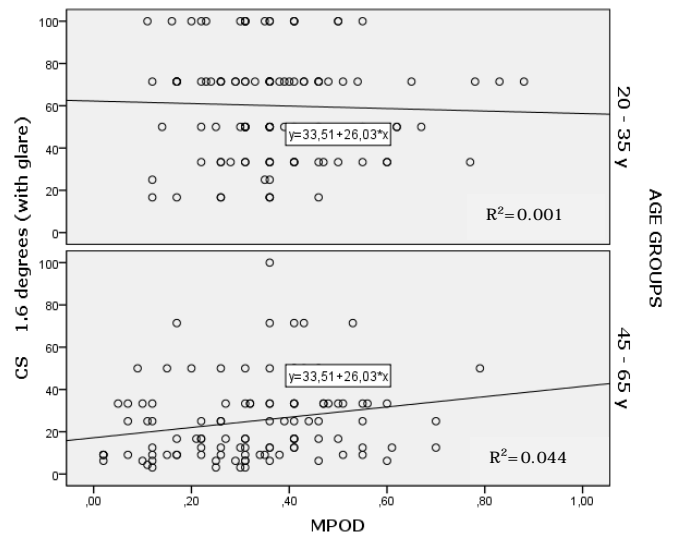
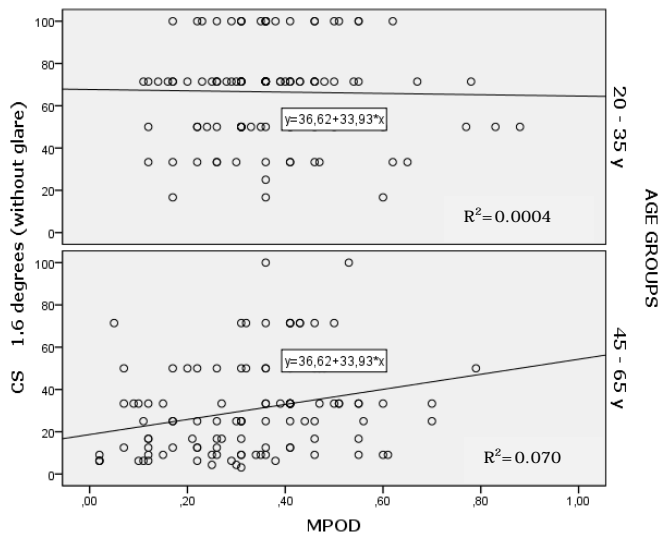


Table 1. Threshold contrast sensitivity at different degrees of visual angle, without and with glare, in two age groups (n=108 eyes per group)

<i>Visual angle of the stimulus (degrees)</i>	Contrast threshold. Mean±SD (median), [95%CI] (n=216 eyes)					
	6.3	4.0	2.5	1.6	1.0	0.7
Without glare*						
Aged 20-35 y ^a	0.012 ± 0.000 (0.01) [0.012 , 0.013]	0.012 ± 0.000 (0.010) [0.011 , 0.012]	0.013 ± 0.001 (0.010) [0.012 , 0.014]	0.019 ± 0.001 (0.014) [0.016 , 0.020]	0.033 ± 0.002 (0.030) [0.029 , 0.036]	0.075 ± 0.006 (0.060) [0.063 , 0.090]
Aged 45-65 y ^b	0.018 ± 0.001 (0.014) [0.016 , 0.020]	0.025 ± 0.002 (0.020) [0.021 , 0.03]	0.036 ± 0.003 (0.025) [0.030 , 0.042]	0.062 ± 0.005 (0.040) [0.051 , 0.072]	0.140 ± 0.011 (0.080) [0.114 , 0.157]	0.273 ± 0.016 (0.230) [0.241 , 0.305]
With glare*						
Aged 20-35 y ^a	0.012 ± 0.000 (0.010) [0.012 , 0.013]	0.012 ± 0.000 (0.010) [0.011 , 0.013]	0.014 ± 0.001 (0.014) [0.013 , 0.016]	0.022 ± 0.001 (0.014) [0.019 , 0.024]	0.041 ± 0.003 (0.03) [0.035 , 0.048]	0.09 ± 0.008 (0.08) [0.08 , 0.11]
Aged 45-65 y ^b	0.018 ± 0.001 (0.014) [0.016 , 0.020]	0.026 ± 0.002 (0.20) [0.021 , 0.031]	0.041 ± 0.004 (0.030) [0.034 , 0.048]	0.074 ± 0.006 (0.06) [0.062 , 0.090]	0.160 ± 0.012 (0.11) [0.140 , 0.190]	0.310 ± 0.020 (0.320) [0.270 , 0.340]

* Significant differences between the two age groups, with and without glare, at any stimulus size (p<0.000)

^a Differences in CT, with and without glare, at 2.5 degrees, p= 0.004; at 1.6 and 1.0 degrees, p = 0.001 and at 0.7 degrees, p=0.000

^b Differences in CT, with and without glare, at 2.6 ° p= 0.006; at 1.6°, 1.0 ° and 0.7° p= 0.000

Table 2. Macular pigment optical density and dietary (fruit and vegetable intake) and biochemical variables (lutein and lutein+zeaxanthin / cholesterol + triglycerides in serum) with which it was significantly correlated in Spanish subjects (n=108), expressed as mean ± standard deviation, (median) and confidence interval [95% CI]. Data from Olmedilla-Alonso et al [21]

Subjects (n=108)	MPOD (density units)	Fruit + vegetable intake (g/day)	Lutein* µg/dl, serum	Lutein + zeaxanthin / cholesterol + triglycerides (µg/mg, serum)
Aged 20-35 y	0.37 ± 0.014 (0.36) [0.34 , 0,40]	388.4 ± 18.2 (410.3) [352.2 ,424.5]	10.9 ± 0.50 (9.90) [10.0 , 11.86]	0.06 ± 0.002 (0.050) [0.05 , 0.06]
Aged 45-65 y	0.33 ± 0.016 (0.32) [0.29 , 0.36]	610.3 ± 28.2 (577.3) [554.4 , 666.2]	14.76 ± 0.64 (13.04) [13.50 , 16.02]	0.06 ± 0.002 (0.054) [0.057 , 0.068]

* Lutein: 0.192 ± 0.009 (aged 20-35y) and 0.259±0.011 (aged 45-65y) µmol/L

Table 3. Correlations (Spearman) of contrast threshold (without and with glare) with MPOD (density units), serum lutein+zeaxanthin / cholesterol +triglycerides (µg/mg), serum lutein (µg/dl) and fruit + vegetable intake (g/day). (*p* value)

	Aged 20–35 years (n=216 eyes)				Aged 45-65 years				Total sample			
	MPOD	Lut + zeax / chol.+TG	Lutein	F+V intake	MPOD	Lut + zeax / chol.+TG	Lutein	F+V intake	MPOD	Lut + zeax / chol.+TG	Lutein	F+V intake
Without glare												
6.3	0.062 (0.524)	-0.215 (0.025)	-0.177 (0.066)	-0.299 (0.002)	- 0.238 (0.013)	-0.029 (0.766)	-0.145 (0.135)	0.039 (0.688)	- 0.152 (0.026)	-0.055 (0.419)	-0.031 (0.647)	-0.052 (0.451)
4.0	0.048 (0.619)	-0.027 (0.784)	-0.045 (0.641)	-0.196 (0.042)	- 0.219 (0.023)	-0.139 (0.151)	-0.220 (0.022)	0.113 (0.244)	- 0.160 (0.018)	-0.011 (0.873)	0.074 (0.282)	0.208 (0.002)
2.5	-0.140 (0.148)	-0.077 (0.430)	-0.104 (0.285)	-0.100 (0.304)	- 0.278 (0.004)	-0.159 (0.100)	-0.209 (0.030)	0.029 (0.769)	- 0.238 (0.000)	-0.041 (0.550)	0.078 (0.257)	0.218 (0.001)
1.6	-0.026 (0.788)	-0.051 (0.600)	-0.072 (0.457)	-0.171 (0.078)	- 0.333 (0.000)	-0.125 (0.196)	-0.176 (0.068)	-0.035 (0.717)	-0.213 (0.002)	0.001 (0.990)	0.121 (0.077)	0.180 (0.008)
1.0	-0.157 (0.104)	-0.045 (0.643)	-0.063 (0.517)	-0.103 (0.287)	- 0.324 (0.001)	-0.207 (0.032)	-0.224 (0.020)	-0.105 (0.278)	- 0.245 (0.000)	-0.032 (0.641)	0.112 (0.100)	0.176 (0.010)
0.7	-0.069 (0.481)	-0.113 (0.246)	0.150 (0.122)	-0.085 (0.382)	- 0.280 (0.003)	-0.133 (0.170)	-0.157 (0.104)	-0.026 (0.788)	- 0.213 (0.002)	-0.037 (0.590)	0.100 (0.142)	0.213 (0.002)
With glare												
6.3	-0.42 (0.668)	-0.139 (0.151)	0.122 (0.208)	0.137 (0.158)	- 0.248 (0.010)	0.043 (0.660)	-0.016 (0.871)	0.160 (0.097)	- 0.182 (0.007)	0.016 (0.817)	0.081 (0.235)	0.264 (0.000)
4.0	0.002 (0.987)	-0.104 (0.284)	-0.071 (0.466)	0.046 (0.635)	- 0.216 (0.025)	- 0.036 (0.710)	-0.074 (0.447)	0.049 (0.613)	- 0.170 (0.012)	- 0.001 (0.986)	0.125 (0.066)	0.223 (0.001)
2.5	0.068 (0.485)	-0.059 (0.543)	-0.063 (0.516)	0.126 (0.195)	- 0.287 (0.003)	-0.116 (0.233)	-0.130 (0.182)	0.013 (0.891)	- 0. 181 (0.008)	- 0.025 (0.717)	0.122 (0.073)	0.260 (0.000)
1.6	0.046 (0.637)	-0.141 (0.145)	0.134 (0.166)	0.037 (0.703)	- 0.283 (0.003)	-0.114 (0.241)	-0.125 (0.196)	0.017 (0.857)	- 0.177 (0.009)	-0.033 (0.626)	0.125 (0.066)	0.265 (0.000)
1.0	-0.041 (0.671)	-0.079 (0.417)	-0.113 (0.246)	0.019 (0.842)	- 0.269 (0.005)	-0.147 (0.128)	-0.184 (0.056)	-0.051 (0.601)	-0.205 (0.002)	- 0.033 (0.625)	0.106 (0.119)	0.232 (0.001)
0.7	-0.002 (0.985)	-0.038 (0.700)	-0.081 (0.405)	-0.030 (0.755)	- 0.241 (0.012)	-0.154 (0.112)	-0.160 (0.098)	-0.048 (0.625)	- 0.176 (0.009)	- 0.016 (0.817)	0.126 (0.066)	0.202 (0.003)

Lut+zeax / chol.+TG (serum)	0.097 (0.318)	---			0. 262 (0.006)	---			0.170 (0.012)	----		
Lutein (serum)	0.104 (0.284)	0.844 (0.000)	---		0.204 (0.034)	0.864 (0.000)	----		0.094 (0.166)	0.830 (0.000)	----	
F+V intake	0.066 (0.498)	0.382 (0.000)	0.447 (0.000)	---	0.350 (0.000)	0.233 (0.015)	0.125 (0.198)	----	0.171 (0.012)	0.326 (0.000)	0.355 (0.000)	--

Table

Table 4. GENLIN analysis of MPOD (density units), biochemical (µg/mg and µg/dl), dietary factors (fruit and vegetable intake, 100 g/day) and sex data associated with contrast threshold, a) without glare, b) with glare. β (SE), [95% CI], p

4.a) WITHOUT GLARE

Visual angle (degrees)	6.3	4.0	2.5	1.6	1.0	0.7
<i>Younger group (20-35 y)</i>						
Constant	-4.19 (0.11) [-4.39 , -3.98] 0.000	-4.50 (0.09) [-4.68 , -4.33] 0.000	-4.25 (0.11) [-4.48 , -4.03] 0.000	-4.02 (0.16) [-4.33 , -3.70] 0.000	0.036 0.01) [0.02 , 0.05] 0.000	0.10 (0.02) [0.06 , 0.15] 0.000
MPOD	0.10 (0.18) [-0.2 6, 0.46] 0.601	0.20 (0.15) [-0.11 , 0.50] 0.203	-0.13 (0.20) [-0.53 , 0.26] 0.512	0.06 (0.28) [-0.49 , 0.62] 0.824	-0.01 (0.01) [-0.04 , 0.01] 0.391	-0.04 (0.04) [-0.11 , 0.04] 0.370
Fruit+vegetable intake	- 0.04 (0.02) [- 0.07 , -0.07] 0.020	-0.03 (0.01) [-0.05 , -0.001] 0.044	-0.20 (0.02) [-0.05 , 0.01] 0.250	-0.01 (0.03) [-0.06 , 0.36] 0.621	0.00 (0.001) [-0.002 , 0.002] 0.837	0.002 (0.003) [-0.005 , 0.008] 0.633
Lut+zeax / chol. + TG	-1.55 (1.81) [-5.09 , 1.99] 0.392	0.64 (1.48) [-2.26 , 3.55] 0.664	1.22 (1.92) [-2.53 , 4.96] 0.523	4.71 (2.69) [-0.57 , 9.99] 0.081	0.18 (0.12) [-0.06 , 0.42] 0.139	0.28 (0.37) [-0.45 , 1.01] 0.455
Lutein	0.001 (0.01) [-0.02 , 0.02] 0.892	0.001 (0.01) [-0.01 , 0.02] 0.615	-0.003 (0.01) [-0.02 , 0.02] 0.735	-0.02 (0.02) [-0.05 , 0.01] 0.120	-0.001 (0.001) [-0.002 , 0.00] 0.138	-0.003 (0.002) [-0.01 , 0.00] 0.082
<i>Older group (45-65 y)</i>						
Constant	-4.00 (0.23) [-4.45 , -3.55] 0.000	-3.99 (0.30) [-4.58 , -3.40) 0.000	-3.23 (0.32) [-3.85 , -2.62] 0.000	-2.41 (0.32) [-3.04 , -1.78] 0.000	0.20 (0.05) [0.11 , 0.30] 0.000	0.34 (0.08) [0.19 , 0.49] 0.000
MPOD	-0.57 (0.33) [-1.21 , 0.08] 0.085	-0.29 (0.42) [-1.11 , 0.53] 0.489	-0.62 (0.46) [-1.51 , 0.27] 0.174	-1.36 (0.46) [-2.27 , -0.46] 0.003	-0.16 (0.07) [-0.30 , - 0.02] 0.030	-0.28 (0.11) [-0.49 , -0.06] 0.013

F+ V intake	0.01 (0.02) [-0.03 , 0.05] 0.553	0.02 (0.02) [-0.04 , 0.06] 0.447	-0.02 (0.03) [-0.07 , 0.03] 0.484	-0.01 (0.26) [-0.06 , 0.04] 0.767	-0.003 (0.004) [-0.01 , 0.01] 0.453	0.002 (0.01) [-0.01 , 0.01] 0.679
Lut +zeax /chol + TG	6.18 (3.46) [-0.59 , 12,96] 0.074	3.06 (4.57) [-5.90 , 12.02] 0.503	7.56 (4.91) [-2.07 , 17.18] 0.124	10.75 (5.27) [0.417 , 21.07] 0.041	0.88 (0.76) [-0.61 , 2,38] 0.246	1.64 (1.17) [-0.65 , 3.93] 0.161
Lutein	-0.04 (0.02) [-0.07 , -0.01] 0.016	-0.04 (0.02) [-0.08 , -0.002] 0.040	-0.06 (0.022) [-0.10 , -0.02] 0.005	-0.07 (0.02) [-0.12 , -0.02] 0.004	-0.006 (0.003) [-0.01 , 0.00] 0.056	-0.009 (0.005) [-0.02 , 0.00] 0.060
sex	0.17 (0.10) [-0.03 , 0.36] 0.089	0.44 (0.12) [0.20 , 0.68] 0.000	0.39 (0.13) [0.13 , 0.65] 0.004	0.26 (0.14) [-0.01 , 0.54] 0.058	0.03 (0.21) [-0.02 , 0.07] 0.23	0.03 (0.03) [-0.04 , 0.10] 0.405

4.b) WITH GLARE

Visual angle (degrees)	6.3	4.0	2.5	1.6	1.0	0.7
<i>Younger group (20-35 y)</i>						
Constant	-4.49 (0.11) [-4.71 , -4.28] 0.000	-4.46 (0.11) [-4.67 , -4.25] 0.000	-0.01 (0.02) [0.01 , 0.02] 0.000	0.02 (0.01) [0.01 , 0.030] 0.000	0.05 (0.01) [0.03 , 0.08] 0.000	0.10 (0.03) [0.05 , 0.16] 0.000
MPOD	-0.01 (0.19) [-0.39 , 0.38] 0.978	-0.11 (0.19) [-0.49 , 0.26] 0.551	-0.002 (0.004) [-0.01 , 0.01] 0.638	-0.01 (0.01) [-0.02 , 0.01] 0.573	-0.03 (0.02) [-0.07 , 0.02] 0.208	-0.04 (0.05) [-0.14 , 0.06] 0.411
Fruit+vegetable intake	0.05 (0.016) [0.02 , 0.08] 0.002	0.04 (0.02) [0.01 , 0.07] 0.014	0.001 (0.0003) [0.000 , 0.002] 0.004	0.002 (0.0007) [0.000 , 0.003] 0.031	0.003 (0.002) [0.000 , 0.01] 0.075	0.003 (0.004) [-0.01 , 0.01] 0.458
Lut + zeax/chol + TG	-1.19 (1.88) [-4.75 , 2.37] 0.512	0.23 (1.80) [-3.28 , 3.74] 0.897	0.00 (0.04) [-0.07 , 0.09] 0.801	0.10 (0.08) [-0.06 , 0.25] 0.219	0.10 (0.21) [-0.33 , 0.50] 0.696	0.66 (0.48) [-0.28 , 1.60] 0.170
Lutein	-0.01 (0.10) [-0.02 , 0.01] 0.618	-0.01 (0.01) [-0.03 , 0.010] 0.386	0.000 (0.002) [-0.001 , 0.000] 0.113	-0.001 (0.0004) [-0.002 , -0.00] 0.036	-0.002 (0.001) [-0.004 , 0.00] 0.093	-0.004 (0.003) [-0.01 , 0.001] 0.110

<i>Older group (45-65 y)</i>						
Constant	-4.28 (0.30) [-4.69 , -3.87] 0.000	-4.11 (0.30) [-4.70 , -3.51] 0.000	0.04 (0.02) [0.01 , 0.07] 0.022	0.08 (0.03) [0.21 , 0.14] 0.008	0.20 (0.06) [0.09 , 0.31] 0.001	0.43 (0.08) [0.27 , 0.58] 0.000
MPOD	-0.89 (0.29) [-1.47 , -0.32] 0.002	-0.19 (0.42) [-1.03 , 0.64] 0.652	-0.04 (0.02) [-0.09 , 0.01] 0.097	-0.08 (0.04) [-0.17 , 0.003] 0.059	-0.15 (0.08) [-0.32 , 0.01] 0.063	-0.21 (0.11) [-0.43 , 0.01] 0.062
Fruit+veg intake	0.01 (0.016) [0.001 , 0.06] 0.045	-0.02 (0.022) [-0.07 , 0.02] 0.289	0.00 (0.001) [-0.002 , 0.003] 0.815	-0.00 (0.002) [-0.005 , 0.005] 0.978	-0.002 (0.0045) [-0.01 , 0.01] 0.586	-0.001 (0.01) [-0.01 , 0.01] 0.889
Lut + zeax/chol + TG	5.63 (3.16) [-0.56 , 11.82] 0.075	10.05 (4.62) [0.99 , 19.11] 0.03	0.29 (0.26) [-0.22 , 0.79] 0.262	0.63 (0.46) [-0.28 , 1.54] 0.173	1.55 (0.88) [-0.17 , 3.27] 0.077	1,54 (1.19) [-0.91 , 3.88] 0.189
Lutein	-0.03 (0.14) [-0.05 , 0.002] 0.073	-0.05 (0.20) [-0.09 , -0.01] 0.008	-0.002 (0.011) [-0.004 , 0.000] 0.100	-0.004 (0.002) [-0.007 , 0.000] 0.074	-0.01 (0,004) [-0.02 , -0,001] 0.026	-0.01 (0.01) [-0.02 , -0.00] 0.045
sex	0.22 (0.09) [0.04 , 0.39] 0.014	0.52 (0.17) [0.27 , 0.77] 0.000	0.01 (0.01) [0.000 , 0.03] 0.042	0.02 (0.01) [-0.002 , 0.05] 0.076	0.04 (0.02) [-0.01 , 0.09] 0.112	0.004 (0.33) [-0.06 , 0.07] 0.893

2. The importance of the food source and its color in the relationship between lutein and zeaxanthin intake from fruit, vegetable and eggs and their associations with nutritional status and the macular pigment optical density in Spanish subjects. British Journal of Nutrition (Enviado 21 de Julio de 2015, en Revisión. Manuscript ID: BJN-RA-15-0791). *Incluido en el Capítulo 1.*

STUDIES IN HUMANS

Assessment of dietary vitamin A intake (retinol, α -carotene, β -carotene, β -cryptoxanthin) and its sources in the National Survey of Dietary Intake in Spain (2009–2010)

Beatriz Beltrán-de-Miguel¹, Rocío Estévez-Santiago², and Begoña Olmedilla-Alonso²

¹Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain and ²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain

Abstract

The aim of this study is to assess the intake of the individual components of vitamin A and major dietary sources in the Spaniards using data on food consumption from Spanish National Dietary Intake Survey (2009–2010). A 24-h dietary recall, 3-day diet diary and a software application that includes HPLC analytical data were used. Average dietary vitamin A intake is 716.4 μ g retinol equivalents (RE), which is supplied as retinol (57.9%RE) and as provitamin-A carotenoids (42.1%RE). β -Carotene represents 71.9% of provitamin-A carotenoids, β -cryptoxanthin 15.3%, α -carotene 12.8%. Red- and orange-colored fruits and vegetables are major contributors of provitamin-A (1587 μ g/day). Spanish diet covers the dietary reference on the intake for vitamin A, provided mainly by foods of animal origin. The main contributors to the intake of provitamin-A carotenoids are carrots, tomatoes, spinach and oranges. Data on the intake of individual components of vitamin A contribute to improving our understanding of the relationship between diet and health.

Keywords

Bioactive compounds, carotenoids, nutritional assessment, provitamin-A, retinol

History

Received 26 February 2015

Revised 30 June 2015

Accepted 7 July 2015

Published online 26 August 2015

Introduction

Vitamin A is a generic term that encompasses a large number of related compounds that show retinol-like activity. In humans, it is an essential nutrient for the normal functioning of the visual system, maintenance of epithelial integrity and immunity, among other roles. Humans obtain vitamin A through diet, either as preformed vitamin A (retinol) in animal products or as provitamin A carotenoids, mainly from plant products (IOM, 2001; Trumbo et al., 2001).

The assessment of nutritional status in populations is of great interest as it permits the evaluation of the suitability of the diet or the risk associated with excessive or inadequate intakes, and aids in decision-making concerning the policy on nutritional intervention. Regarding vitamin A, while its deficiency has been identified by means of biochemical and dietary markers as a public health problem in poor societies, especially in lower income countries (WHO, 2009), in other developed populations, like that of Spain, an insufficient intake has been detected in a considerable percentage of the population (about 10–20%) (AESAN, 2012; Mensink et al., 2013; Serra-Majem et al., 2007).

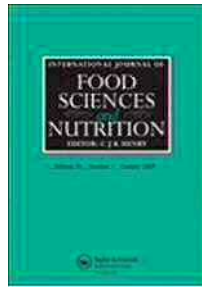
In 2011, the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) published the *Encuesta Nacional de Ingesta Dietética* (ENIDE) [National Survey of Dietary Intake in Spain] corresponding to 2009–2010. Among other findings, the ENIDE revealed that vitamin A intake is not satisfactory, especially in men, as it is less than 80% of the recommended intake (AESAN,

2012). However, although data on nutritional status based on food intake are highly useful for decision-making in the public health setting, as well as in the context of epidemiological studies for the surveillance of populations at risk for disease, their validity is limited. This is due both to the biases derived from the different types of food intake assessment and to the way in which data are presented in food composition tables (i.e. vitamin A is expressed as retinol or as retinol plus carotenoids, etc), as well as the way in which vitamin A activity is measured (as retinol equivalents [RE] or as retinol activity equivalents [RAE]; in the latter form, the contribution of the provitamin A carotenoids is half that assumed when RE are used) (Burri et al., 2009, 2011; Estevez-Santiago et al., 2013a; Tang, 2010).

The objective of this study was to expand the information on vitamin A intake provided in the ENIDE, assessing the intake of the individual components of vitamin A (retinol, α -carotene, β -carotene and β -cryptoxanthin) and identifying the major dietary sources in the Spanish population. We used data on food consumption from the ENIDE survey (AESAN, 2011) and from a database of carotenoids content in foods designed by our group (Beltran et al., 2012). The dietary intake of retinol and carotenoids was calculated for the diet as a whole and according to food groups, breaking the fruit and vegetable group down according to color.

Subjects and methods

The dietary intake of vitamin A in the Spanish population was evaluated using the food consumption data provided by the ENIDE survey, part of a study conducted in 2009 and 2010 by the AESAN, on behalf of the Spanish Ministry of Health,



Assessment of dietary lutein, zeaxanthin and lycopene intakes and their sources in the National Survey of Dietary Intake in Spain (2009-2010)

Journal:	<i>International Journal of Food Sciences and Nutrition</i>
Manuscript ID	CIJF-2015-1023
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	31-Oct-2015
Complete List of Authors:	Estévez-Santiago, Rocío; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CISC), Metabolism and Nutrition Beltrán-de-Miguel, Beatriz; Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Nutrición y Bromatología I Olmedilla-Alonso, Begoña; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Metabolism and Nutrition
Keywords:	food consumption survey, non-provitamin A carotenoids, Bioactive compounds

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Assessment of dietary lutein, zeaxanthin and lycopene intakes and their sources in the**
2 **National Survey of Dietary Intake in Spain (2009-2010)**

3

4 Rocío Estévez-Santiago¹, Beatriz Beltrán-de-Miguel², Begoña Olmedilla-Alonso¹

5

6 ¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid (Spain)

7 ² Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (Spain)

8

9 Corresponding author:

10 B. Olmedilla-Alonso. ICTAN-CSIC. C/ José Antonio Novais, 10. 28040-Madrid (Spain).

11 Phone: +34- 91549 2300. Fax: (+34) 91 549 3627. E-mail address:

12 BOlmedilla@ictan.csic.es

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

Abstract

We assessed the intake and major dietary sources of lutein, zeaxanthin and lycopene in Spain using food consumption data from the Spanish National Dietary Intake Survey (2009–2010). Standard dietary assessment methods and a software application that includes HPLC data were used. Average intake of those carotenoids was 4290.8 $\mu\text{g/day}$ (67.1% total carotenoid intake), mainly supplied by vegetables (3414 $\mu\text{g/day}$), followed by fruits (393.5 $\mu\text{g/day}$), oils/fats (204 $\mu\text{g/d}$), and eggs/egg products (170 $\mu\text{g/day}$). Main sources of lutein and zeaxanthin were vegetables (62.9% total diet, 1235.2 $\mu\text{g/person/d}$). Lycopene intake was 3055.6 $\mu\text{g/day}$ (71.2% of non-provitamin A carotenoids), supplied mainly by tomato and by-products (86.3%) and watermelon. Red- and orange-colored fruits and vegetables were the major contributors of non-provitamin carotenoids (3219 $\mu\text{g/person/d}$). As sources of non-provitamin-A carotenoids, balanced diets should favor fruits and vegetables over other dietary sources (oils, eggs, processed foods) that contain components to be consumed with moderation.

Key words: food consumption survey, non-provitamin A carotenoids, bioactive compounds.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

51 **Introduction**

52 Lutein, zeaxantin and lycopene are plant pigments that belong to the well-known
53 group of carotenoids. They are provided by the diet, specially by fruits and vegetables.
54 Together with the provitamin A carotenoids and other bioactive compounds, they are partly
55 responsible for the protective role in human health that epidemiological studies frequently
56 associate with the consumption of fruits and vegetables (Seddon *et al.*, 1994, Shashirekha *et*
57 *al.*, 2015, Liu 2013, Jomova and Valko 2013). Dietary lutein and zeaxanthin intake and the
58 presence of these compounds in blood and/or tissues have been associated with a lower risk
59 for age-related diseases, such as macular degeneration or cognitive deterioration (Rao *et al.*,
60 2006, Min and Min 2014, Granado *et al.*, 2003, Moeller *et al.*, 2008). Lutein and zeaxanthin
61 are concentrated in retina, where they constitute what it is known as the macular pigment
62 [MP] which protects the photoreceptor cell layer from light damage by filtering blue light,
63 and where they act as scavengers of radical oxygen species (Zampatti *et al.*, 2014, Kijlstra *et*
64 *al.*, 2012, Snodderly 1995). Lutein and zeaxanthin concentrations in the retina increase upon
65 the ingestion of lutein-rich foods (especially spinach, kale, egg yolk and lutein fortified foods)
66 and lutein supplements (Granado *et al.*, 2003, Shardell *et al.*, 2011, Thurnham 2007).
67 Lycopene, another dietary carotenoid present in human blood and tissues, is found in a limited
68 number of foods, specially in tomato and tomato products, and is present in many processed
69 foods in which tomato is used as an ingredient; it is also present in certain fruits (watermelon,
70 etc.) (Naz *et al.*, 2014). Lycopene is the most efficient singlet oxygen quencher *in vitro* (Stahl
71 and Sies 2003) and this biological activity seems to be of interest for human health (i.e.
72 cardiovascular health) (Perveen *et al.*, 2015, Rao *et al.*, 2006). Evidence from epidemiological
73 studies suggests that high consumption of tomato products or lycopene is associated with a
74 significantly lower risk of numerous cancers (Giovannucci 1999, Gann *et al.*, 1999).

1
2
3 75 The biological activity of these carotenoids in the human body (Stahl and Sies 2003)
4
5 76 and the increase in the number of human studies involving these compounds in recent decades
6
7 77 (Krinsky and Johnson 2005, Fiedor and Burda 2014) highlight the importance of the
8
9 78 knowledge of the contents of individual carotenoids in foods for a better understanding of
10
11 79 their role in the relationship between diet and health. However, although there has been an
12
13 80 increase in the number of food composition tables that provide data on the contents of these
14
15 81 three carotenoids in foods (West and Poortvliet 1993, Holden *et al.*, 1999, Holden *et al.*, 1998,
16
17 82 O'Neill *et al.*, 2001) to date, the specific intake of these compounds in relation to health status
18
19 83 is evaluated at the population level in only a few countries (e.g., NHANES in the USA) and
20
21 84 Spain is not among them.
22
23
24

25 85 In Spain, the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) published the
26
27 86 *Encuesta Nacional de Ingesta Dietética* [Spanish Dietary Intake Survey] (ENIDE)
28
29 87 corresponding to 2009-2010 (AESAN, 2011). For the assessment of micronutrient intake, the
30
31 88 ENIDE relied on the *Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA)*
32
33 89 (Spanish Food Composition Database), which is included in the food databases of the
34
35 90 EuroFIR association (European Food Information Resource EUROFIR). The BEDCA does
36
37 91 not include lutein, zeaxanthin or lycopene concentrations in the foods and, thus, the ENIDE
38
39 92 report did not provide individual data on the dietary intake of those carotenoids.
40
41
42

43 93 In a previous report (Beltrán-de-Miguel *et al.*, 2015) we assessed the intake of
44
45 94 provitamin A carotenoids on the basis of food consumption data from the ENIDE survey
46
47 95 (AESAN 2011) and a database of carotenoid content in foods designed by our group (Beltrán
48
49 96 *et al.*, 2012). The objective of the present study was to expand the information provided in the
50
51 97 ENIDE, assessing the intake of lutein, zeaxanthin and lycopene, the non-provitamin-A
52
53 98 carotenoids most frequently studied in terms of the relationship between diet and health, and
54
55 99 identifying their major dietary sources in the Spanish population. The dietary intake of these
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

100 compounds was calculated for the diet as a whole and according to food groups, with the fruit
101 and vegetable group broken down according to color.

102

103 **Subjects and methods**

104 The dietary intake of non-provitamin carotenoids in the Spanish population was
105 evaluated using the food consumption data provided by the ENIDE survey, part of a study
106 conducted in 2009 and 2010 by the AESAN, on behalf of the Spanish Ministry of Health,
107 Social Services and Equality, to determine dietary intake patterns in the adult Spanish
108 population. The ENIDE is a cross-sectional survey involving a sample of non-institutionalized
109 individuals (n= 3000), aged 18-64 years, that was designed to be representative of the Spanish
110 population (AESAN, 2012). Possible participants were randomly selected using a stratified
111 approach that took into account gender, age, season and geographical region, and were invited
112 to participate by phone call followed by a letter with the study information. All participants
113 gave their written informed consent. The ENIDE study took into account demographic
114 characteristics (gender, age, geographical zone, family size and level of education), lifestyle,
115 diet and seasonal consumption, analyzing the same number of surveys in each of the four
116 seasons of the year. The food consumption data were obtained from a 24-h recall completed
117 by each participant with the aid of a trained interviewer, as well as a 3-day diary, which
118 together constituted a record of more than 12000 days of consumption (AESAN, 2012).
119 Using this information, the ENIDE survey revealed the distribution of daily consumption of
120 foods (n>400), classified into 12 groups according to intake. Each food (raw) is expressed in
121 grams or mL (in the case of liquids) per person and per day, considering the overall
122 population (consumers and nonconsumers) (AESAN, 2012).

123 In this study, data on the mean consumption of foods (g/day) based on the ENIDE
124 survey (AESAN, 2011) were used to calculate the intake of the non-provitamin A

1
2
3 125 carotenoids: lutein, zeaxanthin and lycopene. The ENIDE survey gathered information on the
4
5 126 consumption of mixed meals /recipes, recording both the amounts consumed by the
6
7 127 respondents and the way in which the meals were prepared. This information was transformed
8
9 128 into data on the foods and amounts in each recipe, and we used these data to assess the dietary
10
11 129 intake of lutein, zeaxanthin and lycopene. The data on the foods and amounts consumed were
12
13 130 introduced into a specific software application for carotenoids (Estévez-Santiago *et al.*, 2013)
14
15 131 that includes a carotenoid database developed by our group (Beltrán *et al.*, 2012). Data on the
16
17 132 contribution of the different food groups to energy intake among the Spanish population (in
18
19 133 the ENIDE) were previously assessed and published (Beltran-de-Miguel *et al.*, 2015) and
20
21 134 were used to assess said intake expressed in terms of dietary energy density (lutein,
22
23 135 zeaxanthin and lycopene per 1000 kcal). The data on carotenoid concentrations were those
24
25 136 corresponding to raw and cooked foods, depending on how they are usually consumed. This
26
27 137 carotenoid database contains information on the major dietary carotenoids present in foods,
28
29 138 with data generated entirely by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Beltrán *et*
30
31 139 *al.*, 2012, Granado *et al.*, 1992, Olmedilla *et al.*, 1993) using an analytical procedure that is
32
33 140 considered to be highly acceptable (West and Poortvliet 1993). The foods included, mainly
34
35 141 from the plant kingdom, are major contributors to the intake of carotenoids in Europe
36
37 142 (Granado *et al.*, 2007, O'Neill *et al.*, 2001). The food groups included in the software are:
38
39 143 fruit, vegetables, oils and fats, snacks, nonalcoholic beverages, milk and dairy products, eggs
40
41 144 and egg products, sauces and herbs and spices. The individual carotenoid content of each of
42
43 145 these items was multiplied by the amount consumed of edible portion (g/ person / day) and
44
45 146 this provided an estimate of the carotenoid contributed by the food. The sum of the
46
47 147 carotenoid intakes from these foods enabled the calculation of individual and total carotenoid
48
49 148 intakes, as well as their relative contribution.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The major food sources of lutein, zeaxanthin and lycopene in the diet of the Spanish population were determined, and the contribution of the group comprised of fruits, vegetables and other foods of plant origin to the intake of these bioactive compounds is presented for individual items and grouped according to their color (white/yellow, green, red/orange).

Results

The contribution of lutein, zeaxanthin and lycopene in the total diet of the adult Spanish population, and the contribution of the different food groups to said intake are shown in table 1. The sum of these non-provitamin A carotenoids is also included, as are previously published data on the intake of provitamin A carotenoids (β -carotene, α -carotene and β - cryptoxanthin) (Beltran-de-Miguel *et al.*, 2015) to assess the total intake of the major dietary carotenoids. In this table, the lutein and zeaxanthin columns provide intake data of these two carotenoids when they were determined separately, and the lutein-zeaxanthin column shows their combined values obtained from the literature (when a joint value was reported) (see database in Beltrán et al., 2012). The column total L+Z reports the total lutein and zeaxanthin intake. The mean total dietary intake of non-provitamin A carotenoids was 4290.8 $\mu\text{g/d}$ (67.1% of the total carotenoids) and was mainly supplied by vegetables (3414 $\mu\text{g/d}$) and fruits (393.5 $\mu\text{g/d}$), followed by the group of oils and fats (204 $\mu\text{g/d}$). Eggs and egg products constitute the only source of these carotenoids of animal origin (170 $\mu\text{g/d}$).

Dietary intake of lutein (704 $\mu\text{g/person/d}$) was higher than that of zeaxanthin (55 $\mu\text{g/d}$). The total intake of lutein and zeaxanthin (1235.2 $\mu\text{g/d}$) was approximately 2.5-fold lower than that of lycopene (3055.6 $\mu\text{g/d}$). Lycopene represented 71.2% of the non-provitamin A carotenoids analyzed in the Spanish diet and it was provided mainly by one vegetable – tomato (86.3% of the total lycopene intake) and a fruit, watermelon. The main source of lutein and zeaxanthin are vegetables (62.9% of the total dietary intake) and the

174 contribution of the groups of oils and fats and, to a lesser extent, that of eggs and egg products
175 (16.5% and 5.2%, respectively).

176 The contribution of the different vegetables and fruits (g/d) to the intake of lutein,
177 zeaxanthin and lycopene is shown in table 2, as are the amounts of total and individual non-
178 provitamin A carotenoids supplied daily by each of these foods. Spinach (182.7 µg/d, total
179 L+Z) and curly kale (173.8µg/d, total L+Z) were the major sources of lutein and zeaxanthin
180 which, together, provided 28.9% of the total intake of these carotenoids in the diet as a whole.
181 Together peppers and Swiss chard, they constituted 35.4% of the total L+Z intake. Fruits
182 provided 5.2% of the dietary lutein and zeaxanthin intake, with orange as the leading
183 contributor by a small margin (33.4 µg/d of L+Z), as it was consumed in greater amounts
184 (34.6 g/d), supplying 52.4% of the L+Z contributed by the group of fruits. Dietary lycopene
185 came mainly from a single vegetable, tomato (86.3% of the lycopene intake), followed by a
186 fruit, watermelon (10.6% of the total dietary lycopene).

187 Finally, table 3 shows the lutein, zeaxanthin and lycopene intake provided by fruits
188 and vegetables grouped according to their color as white/yellow, red/orange and green. When
189 compared to foods of other colors, the red and orange fruits and vegetables were, by far, those
190 that contributed the greatest amount of non-provitamin A carotenoids when considered as a
191 whole (75%), and all the dietary lycopene. However, considering non-provitamin A
192 carotenoids individually, lutein and zeaxanthin were mainly supplied by green fruits and
193 vegetables (51.1%), whereas red/orange colored items provided 13.2% and those of
194 white/yellowish color (21.9%). The fruits and vegetables of red/orange color supplied 97.1%
195 of the lycopene intake.

196

197

198

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

In this report, we present the first data on lutein, zeaxanthin and lycopene intakes in a Spanish population (a representative sample at the national level), which were calculated on the basis of a direct dietary survey using a methodology for the analysis of the intakes of individual carotenoids. This survey methodology is of the type chosen by EuroFIR (Martinez Burgos *et al.*, 2009) in the attempt to harmonize and standardize food consumption data from different countries.

Until now, information on the intakes of these carotenoids in Spain has been very limited, and the available data, national and international, have been provided by studies with considerable differences in methodology that affect the comparability of the results obtained. This is especially true for databases of carotenoid composition in foods and the types of dietary questionnaires employed, a circumstance that could explain the very different intake levels found in the literature (Kant *et al.*, 2015, USDA-ARS, 2012, O'Neill *et al.*, 2001). Previous data on the intake of non-provitamin A carotenoids in the Spanish population, from fruit and vegetable consumption (major contributors to their intake) but not from the total diet, were published by Granado *et al.* (Granado *et al.*, 2007). Those data were based on calculations of consumption frequencies obtained from the household budget surveys carried out by the Spanish Institute of Statistics in 1964, 1980 and 1996 and from a food consumption survey carried out by the Ministry of Agriculture in 2004 (table 4). Although those authors used different surveys, the food composition data reported in their studies (Granado *et al.*, 1992, Olmedilla *et al.*, 1993) were included and expanded in the carotenoid database employed in the present study (Beltrán *et al.*, 2012).

To compare our data with those from Granado *et al.* (Granado *et al.*, 2007), we consider only the fruit and vegetable intakes (476 g fruit+vegetables/p/d; 263 g vegetables/p/day and 213 g fruit/p/d) according to the Spanish food consumption reported by

the ENIDE (AESAN, 2011) as contributors to lutein, zeaxanthin and lycopene intake. The lutein and zeaxanthin intake (840.2 $\mu\text{g/p/d}$) and lycopene intake (2967 $\mu\text{g/p/d}$) are higher in the present study, in both cases, doubling the values obtained with the 2004 food consumption survey (Granado *et al.*, 2007). This difference may be due to the increase in the varieties of fruits and vegetables recorded in the ENIDE (around 30 different vegetables and 20 fruits) compared to the 12 vegetables and 16 fruits considered in the calculation of the survey of 2004 (at that time, those items represented at least 89% of the total consumption of fresh fruit and vegetables in Spain (Granado *et al.*, 2007)), as well as to the availability of more data on carotenoid composition in the present study. For example, for the lycopene calculations, the 2004 survey did not take into account the contribution of sauces and juices (i.e., tomato sauce and tomato juice).

A dietary survey comparable to the ENIDE was used in the National Health and Nutrition Examination Survey in the U.S. (NHANES 2009-2010) (2012), in which the intake of lycopene was 5.26 mg/day and that of lutein + zeaxanthin was 1.36 mg/day (which, expressed in mg per 1000 kcal, are 2.53 mg lycopene/1000 kcal and 0.65 mg lutein+zeaxanthin/1000 kcal). The lycopene intake in the U.S. is much higher than in Spain and the lutein+zeaxanthin intake is slightly higher. These discrepancies could be due to an underestimation of the lycopene and of the lutein+zeaxanthin intakes as the foods grouped as “others” were not taken into account in the estimation of these intakes. That group included prepared foods, which can include tomato or lycopene as a color additive and constitute relevant sources in some countries (e.g., Belgium) (Vandevijvere *et al.*, 2014), as well as foods derived from grains, which can contain lutein+zeaxanthin (e.g., maize, although the consumption of these foods is of little importance in the Spanish diet). Although there are few data in Spain on the food composition of the many processed or ready-to-eat foods that are commercially available and the consumption of which is on the rise (Hoffman and Gerber

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2015) their contribution should not be overlooked because it could result in the underestimation of the dietary carotenoid intake.

The lutein and zeaxanthin intake in this study in a Spanish population aged 18 - 64 years (1.23 mg/p/d) is similar to that found in a recent study in apparently healthy individuals (n=108; aged 20-35 and 45-65 years), in which the dietary intake was 1.17 mg/p/d (Olmedilla-Alonso *et al.*, 2014), and was measured using 3-day food records involving 24-h recalls and the same food database employed in the present study. However, the total dietary lutein and zeaxanthin intake is much lower in this report than that found in European subjects (n=400) more than a decade ago, as the intake in the Spanish subgroup (n=80) was 3.25 mg/day (range: 1.8-4.3 mg/d) (Olmedilla *et al.*, 2001), which contrasts with the 1.23 mg/d of this study. The opposite occurs with lycopene, the intake of which (3.06 mg/p/d) is higher than in the aforementioned Spanish subgroup (median 1.64 and range 0.50 to 2.64 mg/p/d). In the two studies, the food composition data was identical for most of the foods; however, the European study was based on a semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ), whereas in the present study, 3-day food records were employed, and FFQ have been reported to overestimate carotenoid intake (George *et al.*, 2012), especially that of lutein and zeaxanthin, when the findings with these two tools are compared (Granado-Lorencio *et al.*, 2006).

The intake of non-provitamin A carotenoids from fruits and vegetables in proportion to the intake of total carotenoids (67.3%) in the Spanish population is higher than that reported with the data from the survey of 2004, in which it represented 50% of the total intake (Granado *et al.*, 2007). Fruits supply similar amounts of carotenoids with and without provitamin A activity, but vegetables are richer in non-provitamin A carotenoids (68.8 %) (Table 1). Lutein and zeaxanthin represent the 14.8% of the total carotenoids from fruits and vegetables, which is similar to the percentage obtained with the 2004 survey (14%).

1
2
3 274 In the present study, sources of lutein and zeaxanthin like the eggs and oils are
4
5 275 included, but were not evaluated in the study of Granado et al (Granado *et al.*, 2007).
6
7 276 Specifically, olive oil, widely used as a cooking oil in Spain (AESAN, 2011), provides 16.5%
8
9 277 of the total lutein and zeaxanthin intake. However, it is important to stress the benefits of
10
11 278 fruits and vegetables in comparison to other sources of carotenoids, such as oils, because they
12
13 279 have a high nutrient density, accompanied by a low energy density (defined as kcal per gram
14
15 280 of food). Oil has an energy density 20 times higher than fruits and vegetables and, thus, the
16
17 281 health recommendation for oil consumption (30-40 g/day) would detract from the importance
18
19 282 of this food if compared with fruits and vegetables in any health campaign. In this respect, the
20
21 283 lutein and zeaxanthin density ($\mu\text{g}/1000 \text{ kcal}$) in vegetables is maximal (8.95 mg/1000 kcal), a
22
23 284 fact that makes promotions of the consumption of this food group, which provides other
24
25 285 bioactive components of interest, more convincing. They should be given priority in the
26
27 286 design of balanced diets and preference over other carotenoid-rich foods (sauces and
28
29 287 processed foods) (Vandevijvere *et al.*, 2014), the consumption of which should be limited
30
31 288 because of the possible harmful effects of excessive amounts of some of their ingredients
32
33 289 (salt, fat, cholesterol, etc.). On the other hand, the correlation of serum lutein and zeaxanthin
34
35 290 with fruit and vegetable intake is higher than that observed with the lutein and zeaxanthin
36
37 291 concentration in the total diet (Olmedilla-Alonso *et al.*, 2014).
38
39
40
41
42

43 292 Among the fruits and vegetables, spinach and curly kale provide 46% of the lutein and
44
45 293 zeaxanthin intake from this food group, which corresponds to 28.9% of the total dietary
46
47 294 intake. However, we must not overlook the contributions of other vegetables, although the
48
49 295 consumption of some of them ranges from $<1 \text{ g/day}$ (e.g. watercress, lamb's lettuce), because
50
51 296 together they provide 7.1% of the lutein+zeaxanthin in the total diet. With respect to
52
53 297 lycopene, one vegetable (tomato) and one fruit (watermelon) are its main sources, of lycopene
54
55 298 as has been reported in other studies (Granado *et al.*, 1996, Rodriguez Amaya 2001)
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The dietary intake of fruits and vegetables in this study (392 g/day: 213 g/day fruit and 179 g/day vegetables [edible portion, excluding potatoes and tubers]) practically meets the amounts of fruits and vegetables recommended by the WHO (400 g/day, excluding potatoes and starchy tubers) (WHO/FAO, 2003). However, it does not meet the amounts recommended by the World Cancer Research Fund International (WCRF, 2007) for public health goals: 600 g/p/day of a range of non-starchy vegetables and fruits that comprises items of different colors, including red, green, yellow, white, purple and orange. On the other hand, the different distributions of these carotenoids in fruits and vegetables grouped according to their color supports the need to explain to the general population the benefits derived from diets that include not only a high amount of fruits and vegetables, but that these foods should be of a variety of colors (Heber and Bowerman 2001); this recommendation is being issued by several organizations (WCRF 2007, USDA 2011) and is used as a diet quality index (Vadiveloo *et al.*, 2015, Vadiveloo *et al.*, 2014).

There are no dietary reference intakes for the bioactive components, as their absence from the diet is presumably not deleterious to health (e.g., does not cause a deficiency syndrome) (Harper 1999), but on the basis of studies of many different types and the biological activities of these compounds, suggestions for intake levels that could decrease the risk of several chronic diseases have been made. For lutein, an intake of 6 mg/day has been suggested to decrease risk of some chronic diseases (Granado *et al.*, 2003). This level is much higher than the lutein intake of the Spanish population, which would represent only 14% of said amount. On the other hand, according to the observed safe level risk assessment method, the evidence of safety is strong at intakes up to 20 mg/d for lutein and 75 mg/d for lycopene (Shao and Hathcock 2006), amounts difficult to achieve by dietary means without the incorporation to the diet of fortified foods.

324 Conclusions

325 The identification of the major sources of lutein, zeaxanthin and lycopene and their
326 intakes in the Spanish population will be useful for decisions in the public health setting, as
327 those carotenoids account for more than half of the total dietary carotenoid intake in said
328 population and can play a role in different biological activities of interest in humans.
329 Moreover, it is of the utmost importance that the efforts to harmonize the results continue,
330 with a standardization of the methodology and databases utilized in dietary studies. This
331 would enable a more reliable approach to the establishment of adequate reference intake
332 levels related to the physiological effect of these compounds.

333 To date, the recommendations of international organizations (WHO, WCRF) with
334 respect to increasing the consumption of fruits and vegetables, and moreover, of a variety of
335 colors, is essential for lutein, zeaxanthin and lycopene intake, as in the Spanish population,
336 this food group provides nearly 90% of these carotenoids. Specifically, lycopene is ingested
337 mainly from red/orange fruits and vegetables, almost exclusively tomato and watermelon; and
338 lutein and zeaxanthin are found in green-colored foods, mainly spinach and curly kale.

340 Acknowledgments

341 Rocío Estévez Santiago is the recipient of a JAEPredoc grant from the Spanish Consejo
342 Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), awarded under the program of the Junta para
343 la Ampliación de Estudios, co-financed by the European Social Fund (ESF).

344 Declaration of interest

345 Rocío Estévez-Santiago is the recipient of a JAEPredoc grant from the Spanish Consejo
346 Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), awarded under the program of the Junta para
347 la Ampliación de Estudios, cofinanced by the European Social Fund (ESF).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2011). Datos de consumo de alimentos (gramos/día) a partir del estudio ENIDE. 2011. Available at: http://www.aesan.mspsi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/datos_consumo/ENIDE.pdf. Accessed on July (2014)

AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2012). Evaluación Nutricional de la Dieta Española II. Micronutrientes. Available at: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/estudios_evaluacion_nutricional/Valoracion_nutricional_ENIDE_micronutrientes.pdf. Accessed on July 2015. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). 2012. Evaluación Nutricional de la Dieta Española II. Macronutrientes. Available at: http://www.aesan.mspsi.gob.es/en/AESAN/web/evaluacion_riesgos/subseccion/enide.shtml and at: http://aesan.msssi.gob.es/en/AESAN/web/notas_prensa/presentacion_enide.shtml. Accessed on July 2014.

BEDCA, Base Española de Datos de Composición de Alimentos. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN (2006). Available at: <http://www.bedca.net/> Accessed July (2015).

Beltran-de-Miguel, B., Estevez-Santiago, R. & Olmedilla-Alonso, B. (2015). Assessment of dietary vitamin A intake (retinol, alpha-carotene, beta-carotene, beta-cryptoxanthin) and its sources in the National Survey of Dietary Intake in Spain (2009-2010). *Int J Food Sci Nutr* , **66**, 706-712.

Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S. & Olmedilla Alonso, B. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; Utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutr Hosp.*, **27**, 1334-1343.

- 373 Estévez-Santiago, R., Beltrán-de-Miguel, B., Cuadrado-Vives, C. & Olmedilla-Alonso, B.
374 (2013). Software application for the calculation of dietary intake of individual
375 carotenoids and of its contribution to vitamin A intake. *Nutr Hosp.*, **28**, 823-829.
- 376 EuroFIR. European Food Information Resource EUROFIR. Available at:
377 http://www.eurofir.org/?page_id=14 Accessed on September 2015.
- 378 Fiedor, J. & Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human
379 Health and Disease. *Nutrients*, **6**, 466-488.
- 380 Gann, P. H., Ma, J., Giovannucci, E., Willett, W., Sacks, F. M., Hennekens, C. H. &
381 Stampfer, M. J. (1999). Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma
382 lycopene levels: Results of a prospective analysis. *Cancer Res*, **59**, 1225-1230.
- 383 George, S. M., Thompson, F. E., Midthune, D., Subar, A. F., Berrigan, D., Schatzkin, A. &
384 Potischman, N. (2012). Strength of the relationships between three self-reported
385 dietary intake instruments and serum carotenoids: the Observing energy and protein
386 Nutrition (OPEN) Study. *Public Health Nutrition*, **15**, 1000-1007.
- 387 Giovannucci, E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of
388 the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute*, **91**, 317-331.
- 389 Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Blanco-Navarro, I., Botella-Romero, F. &
390 Simal-Anton, A. (2006). Assessment of carotenoid status and the relation to glycaemic
391 control in type I diabetics: a follow-up study. *Eur J Clin Nutr*, **60**, 1000-1008.
- 392 Granado, F., Blazquez, S. & Olmedilla, B. (2007). Changes in carotenoid intake from fruit
393 and vegetables in the Spanish population over the period 1964-2004. *Public Health*
394 *Nutrition*, **10**, 1018-1023.
- 395 Granado, F., Olmedilla, B., Bianco, I. & RojasHidalgo, E. (1996). Major fruit and vegetable
396 contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr*, **50**,
397 246-250.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

398 Granado, F., Olmedilla, B. & Blanco, I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in
399 human health. *Br J Nutr*, **90**, 487-502.

400 Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. & Rojashidalgo, E. (1992). Carotenoid composition in
401 raw and cooked spanish vegetables. *J Agric Food Chem*, **40**, 2135-2140.

402 Harper, A. (1999). Defining the essentiality of nutrients. In: Modern Nutrition in Health and
403 disease (edited by SHILS, M., OLSON, J., SHIKE, M. & ROSS, A.). Pp. 3-10.
404 Baltimore: Williams and Wilkins.

405 Heber, D. & Bowerman, S. (2001). Applying science to changing dietary patterns. *J Nutr*,
406 **131**, 3078S-3081S.

407 Hoffman, R. & Gerber, M. (2015). Food Processing and the Mediterranean Diet. *Nutrients*, **7**,
408 7925-7964.

409 Holden, J., Bhagwat, S., Beecher, G., Davis, C., Buzzard, I. M., Eldridge, A., Schakel, S.,
410 Trainer, D., Gebhardt, S. & Haytowitz, D. (1998). USDA/NCC database for
411 carotenoids in US foods. *Faseb J*, **12**, A543-A543.

412 Holden, J. M., Eldrige, A. L., Beecher, G. R., Buzzard, I. M., Bhagwat, S., Davis, C. S.,
413 Douglass, L. W., Gebhardt, S., Haytowitz, D. & Schakel, S. (1999). Carotenoid
414 Content of U.S. Foods: An Update of the Database. *J. Food Comp. Anal.*, **12**, 169-196.

415 Jomova, K. & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their
416 interactions with other biological antioxidants. *Eur J Med Chem*, **70**, 102-110.

417 Kant, A. K., Whitley, M. I. & Graubard, B. I. (2015). Away from home meals: associations
418 with biomarkers of chronic disease and dietary intake in American adults, NHANES
419 2005-2010. *Int J Obes*, **39**, 820-827.

420 Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly, E. R. & Berendschot, T. T. J. M. (2012). Lutein: More than just a
421 filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, **31**, 303-315.

- 422 Krinsky, N. I. & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and
423 disease. *Mol Aspects Med*, **26**, 459-516.
- 424 Liu, R. H. (2013). Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet.
425 *Advances in Nutrition*, **4**, 384S-392S.
- 426 Martinez Burgos, M. A., Martinez-Victoria, I., Mila, R., Farran, A., Farre, R., Ros, G., Yago,
427 M. D., Audi, N., Santana, C., Lopez Millan, M. B., Lopez, S. R., Manas, M.,
428 Martinez-Victoria, E. & Network, B. (2009). Building a unified Spanish food database
429 according to EuroFIR specifications. *Food Chem*, **113**, 784-788.
- 430 Min, J. Y. & Min, K. B. (2014). Serum Lycopene, Lutein and Zeaxanthin, and the Risk of
431 Alzheimer's Disease Mortality in Older Adults. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **37**, 246-
432 256.
- 433 Moeller, S. M., Volland, R., Tinker, L., Blodi, B. A., Klein, M. L., Gehrs, K. M., Johnson, E.
434 J., Snodderly, M., Wallace, R. B., Chappell, R. J., Parekh, N., Ritenbaugh, C., Mares,
435 J. A. & Grp, C. S. (2008). Associations between age-related nuclear cataract and lutein
436 and zeaxanthin in the diet and serum in the Carotenoids in the Age-Related Eye
437 Disease Study (CAREDS), an ancillary study of the women's health initiative. *Arch*
438 *Ophthalmol*, **126**, 354-364.
- 439 Naz, A., Butt, M. S., Sultan, M. T., Qayyum, M. M. N. & Niaz, R. S. (2014). Watermelon
440 lycopene and allied health claims. *Excli Journal*, **13**, 650-666.
- 441 O'Neill, M. E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Van den
442 Berg, H., Hininger, I., Rousell, A. M., Chopra, M., Southon, S. & Thurnham, D. I.
443 (2001). A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a
444 five-country comparative study. *Br J Nutr*, **85**, 499-507.
- 445 Olmedilla-Alonso, B., Beltran-de-Miguel, B., Estevez-Santiago, R. & Cuadrado-Vives, C.
446 (2014). Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

447 dietary intake, serum concentrations, lipid profile and macular pigment optical
448 density. *Nutrition J*, **13**.

449 Olmedilla, B., Granado, F. & Rojas-Hidalgo, E. (1993). Quantitation of provitamin and non
450 provitamin A carotenoids in fruits most frequently consumed in Spain. In: Food and
451 Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects. Pp. 141-145.

452 Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A. J. A., Blanco, I., Gil-Martinez, E., van
453 den Berg, H., Corridan, B., Roussel, A. M., Chopra, M. & Thurnham, D. I. (2001).
454 Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from
455 five European countries. *Br J Nutr*, **85**, 227-238.

456 Perveen, R., Suleria, H. A. R., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I. & Ahmad, S. (2015).
457 Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism,
458 Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims-A Comprehensive Review. *Crit Rev*
459 *Food Sci Nutr*, **55**, 919-929.

460 Rao, A. V., Ray, M. R. & Rao, L. G. (2006). Lycopene. *Adv Food Nutr Res*, **51**, 99-164.

461 Rodriguez Amaya, D. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. OMNI Research, ILSI
462 Press. Washington, D. C.

463 Seddon, J. M., Ajani, U. A., Sperduto, R. D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T. C., Farber, M.
464 D., Gragoudas, E. S., Haller, J., Miller, D. T., Yannuzzi, L. A. & Willett, W. (1994).
465 Dietary carotenoids, vitamin-A, vitamin-C, and vitamin-E, and advanced age-related
466 macular degenerataion. *JAMA*, **272**, 1413-1420.

467 Shao, A. & Hathcock, J. N. (2006). Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene.
468 *Regul Toxicol Pharmacol*, **45**, 289-298.

469 Shardell, M., Alley, D., Hick, G. & El-Kamary, S. (2011). Low-serum carotenoid
470 concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third
471 National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr. Res.*, **31**, 178-189.

- Shashirekha, M. N., Mallikarjuna, S. E. & Rajarathnam, S. (2015). Status of Bioactive Compounds in Foods, with Focus on Fruits and Vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **55**, 1324-1339.
- Snodderly, D. M. (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr*, **62**, 1448-1461.
- Stahl, W. & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*, **24**, 345-351.
- Thurnham, D. I. (2007). Macular zeaxanthins and lutein - a review of dietary sources and bioavailability and some relationships with macular pigment optical density and age-related macular disease. *Nutr Res Rev*, **20**, 163-179.
- USDA-ARS, U.S. Department of Agriculture Agricultural Research Service (2012). What We Eat in America, NHANES 2009-2010.
- USDA, U.S. Department of Agriculture Agricultural Research Service (2011). choosemyplate.gov-vegetable-food gallery-Commonly eaten vegetables in each subgroup.
- Vadiveloo, M., Dixon, L. B., Mijanovich, T., Elbel, B. & Parekh, N. (2014). Development and evaluation of the US Healthy Food Diversity index. *Br J Nutr*, **112**, 1562-1574.
- Vadiveloo, M., Parekh, N. & Mattei, J. (2015). Greater healthful food variety as measured by the US Healthy Food Diversity Index is associated with lower odds of metabolic syndrome and its components in US adults (vol 145, pg 564, 2015). *J Nutr*, **145**, 1373-1373.
- Vandevijvere, S., Cucu, T., Vinkx, C., Huvaere, K., Huybrechts, I. & Van Looy, J. (2014). Dietary intake of lycopene by the Belgian adult population. *Public Health Nutrition*, **17**, 248-255.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

496 West, C. & Poortvliet, E. (1993). The carotenoid content of foods with special reference to
497 developing countries. VITAL, International Science and Technology Institute,
498 Arlington, Virginia.

499 WCRF, World Cancer Research Fund International (2007). Food, Nutrition, Physical
500 Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington DC:,
501 AICR.

502 WHO, World Health Organization/Food and Agricultural Organization of the United Nations
503 (WHO/FAO) (2003). Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health:
504 Promoting fruit and vegetable consumption around the world. (edited by
505 ORGANIZATION, W. H.).

506 Zampatti, S., Ricci, F., Cusumano, A., Marsella, L. T., Novelli, G. & Giardina, E. (2014).
507 Review of nutrient actions on age-related macular degeneration. *Nutr Res*, **34**, 95-105.

Table 1. Daily lutein (L), zeaxanthin (Z), lycopene and energy intake from the different food groups in the Spanish adult population

	Total intake (g)	Edible portion (g)	Energy (kcal)	Lutein (µg)	Zeaxanthin (µg)	Lutein-zeaxanthin ^c (µg)	Total L+Z (µg)	L+Z (per 1000 kcal)	Lycopene (µg)	Total carotenoids (µg)	Non-provitamin carotenoids	Non-provit /1000 kcal	Provitamin A carotenoids ^d
Milk & dairy products	307	306	271	0.00	0.00	0	0	0	0	28.7	0.00	0.0	28.70
Meat & meat products	194	175	358	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
Fish & seafood products	89.8	65.9	79.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
Vegetables	261.1	221.1	86.7	461.2	35.1	280.0	776.4	8954.5	2637.6	4964.8	3414.0	39377.2	1495.0
Fruits	231	182	130	39.1	19.7	5.0	63.8	490.6	329.7	687.9	393.5	3027.0	294.4
Eggs & egg products	31.2	27.1	43.9	0.00	0	169.9	169.9	3868.9	0	173.4	169.9	3868.9	3.6
Oils & fat	34.4	34.4	304	203.9	0	0.00	203.9	670.7	0	277.7	203.9	670.7	73.9
Beverages	1992	1992	169	0	0	20.2	20.2	119.6	37.7	180.6	57.9	342.9	122.6
Aperitifs & appetizers ^a	11	10.3	42.6	0	0	0.00	0.0	0	0	5.9	0.00	0.0	5.9
Sauces & herbs & spices	12.7	12.5	22.2	0	0	1.07	1.1	48.2	50.5	77.95	51.6	2322.6	26.4
Others ^b	227.8	227.8	723	na ^f	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Total	3392	3254	2230	704.2	54.9	476.1	1235.2 ^e	553.9	3055.6	6397.0	4290.8	1924.1	2106.4

^a The appetizer group includes olives, a salt corn snack (crusts or "rinds"), cocktail crackers, a salted cheese snack (puffs or doodles), popcorn, potato chips, pickles.

^b Grains and grain products, precooked meals, sugars, sweets and baked goods.

^c Lutein-zeaxanthin: dietary content of lutein and zeaxanthin analyzed jointly in certain foods for which separate values for these two carotenoids are not available.

^d Previously published data (Beltran-de-Miguel *et al.*, 2015)

^e Total theoretical intake is 0.0437 mg/kg body weight per day, considering mean body weight to be 70 kg.

^f na: no available data.

Table 2. Vegetable and fruit consumption (g/day) in the Spanish adult population and its contribution to daily lutein, zeaxanthin and lycopene intake (µg/day)

Food	Total intake	Non-provitamin A carotenoids	Lutein	Zeaxanthin	Lutein+Zeaxanthin	Total L+Z	Total L+Z	Lycopene	Lycopene
Total diet	3392	4290.8	704.2	54.9	476.1	1235.2	0.4	3055.6	0.9
Vegetables	261.1	3414.0	461.2	35.1	280	776.3	3.0	2637.6	10.1
Artichoke	2.6	2.0	2.0	0	0	2.0	0.8	0	0.0
Asparagus (wild)	1.8	5.5	5.5	0	0.0	5.5	3.0	0	0.0
Broad bean (cooked)	1.2	7.8	0.0	0	7.8	7.8	6.5	0	0.0
Broccoli	0.1	1.1	1.1	0	0.0	1.1	10.7	0	0.0
Cabbage	1.1	0.6	0.5	0.1	0.0	0.6	0.5	0	0.0
Carrot (raw and cooked)	10.1	24.8	24.8	0.0	0.0	24.8	2.5	0	0.0
Celery (white, green)	0.7	3.1	3.1	0.0	0.0	3.1	4.4	0	0.0
Corn	2.1	17.1	0.7	0.4	16.1	17.1	8.1	0.0	0.0
Cucumber	5.4	0.6	0.6	0.0	0.0	0.6	0.1	0.0	0.0
Curly kale	1.1	173.8	0.0	0.0	173.8	173.8	158.0	0.0	0.0
Eggplant	3.38	25.9	0.0	0.0	25.9	25.9	7.7	0.0	0.0
Green bean	9.1	30.9	30.9	0.0	0.0	30.9	3.4	0.0	0.0
Lamb's lettuce	0.3	13.1	13.1	0.0	0.0	13.1	43.6	0.0	0.0
Leek	1.9	0.5	0.5	0.0	0.0	0.5	0.3	0.0	0.0
Lettuce	20.7	30.4	30.4	0.0	0.0	30.4	1.5	0.0	0.0
Onion	23.3	0.4	0.4	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
Pepper (red/green)	14.4	41.0	23.3	17.7	0.0	41.0	2.8	0.0	0.0
Potato	68.9	8.2	6.1	2.1	0.0	8.2	0.1	0.0	0.0
Pumpkin	2.2	10.7	10.7	0.0	0.0	10.7	4.9	0.0	0.0
Rocket	0.2	16.1	16.1	0.0	0.0	16.1	80.6	0.0	0.0
Scallion	0.3	0.7	0.0	0.0	0.7	0.7	2.2	0.0	0.0
Spinach	5.2	182.7	167.8	15.0	0.0	182.7	35.1	0.0	0.0
Swiss chard	3	39.5	39.5	0.0	0.0	39.5	13.2	0.0	0.0
Tomato (fresh tomato sauce)	65.9	2678.2	39.8	0.0	0.0	39.8	0.6	2638.5	40.0
Turnip greens or tops	0.44	37.1	0.0	0.0	37.1	37.1	84.4	0.0	0.0
Watercress	0.3	19.9	0.0	0.0	19.9	19.9	66.4	0.0	0.0
Zucchini	7.1	6.1	6.1	0.0	0.0	6.1	0.9	0.0	0.0
Vegetable group (individual item: 1-3 g/day)	16.9	205.7	19.6	0.1	186.0	205.7	12.2	0.0	0.0
Vegetable group (individual item intake < 1 g/day)	3.24	88.2	30.4	0.0	57.8	88.2	27.2	0.0	0.0

Fruits	231 (182)	393.5	39.1	19.7	5.0	63.8	0.3	329.7	1.4
Avocado	1	2.3	2.3	0.0	0.0	2.3	2.3	0.0	0.0
Apple	41.4	2.0	2.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
Banana	24.3	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
Cherry	2	1.0	0.7	0.1	0.0	0.8	0.4	0.2	0.1
Grapefruit	0.4	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	10.3
Kiwifruit	7.1	3.2	3.2	0.0	0.0	3.2	0.5	0.0	0.0
Orange	34.6	33.4	17.0	16.5	0.0	33.4	1.0	0.0	0.0
Papaya	0.9	0.5	0.0	0.0	0.5	0.5	0.6	0.0	0.0
Peach	15.3	5.0	1.7	3.2	0.1	5.0	0.3	0.0	0.0
Pear	18.3	1.6	1.6	0.0	0.0	1.6	0.1	0.0	0.0
Persimmon	0.6	5.1	0.0	0.0	4.3	4.3	7.1	0.8	1.4
Strawberry	2.8	0.4	0.4	0.0	0.0	0.4	0.1	0.0	0.0
Watermelon	17	329.9	5.3	0.0	0.0	5.3	0.3	324.6	19.1
Yellow plum	3	2.3	2.3	0.0	0.0	2.3	0.8	0.0	0.0

Items that contribute with less than 0.3 µg/day of non-provitamin A carotenoids: a) Vegetables: beet (canned), cauliflower, mushroom, red cabbage, sweet potato; b) Fruits: apricot, blackberry, blueberry, fruit cocktail, grape, lemon, loquat, mango, melon, pineapple, tangerine.

Table 3. Lutein, zeaxanthin and lycopene intake (µg/day) supplied by fruits and vegetables classified according to color.

Fruit and vegetables grouped according to color	Lutein	Zeaxanthin	Lutein-Zeaxanthin	Total L+Z	Lycopene	Total carotenoids	Non-provitamin A carotenoids	% Total non-provitamin A carotenoids intake
White/yellow	225.8	2.4	42.8	271.0	0	385.2	271.0	70.4
Red/orange	100.1	37.5	26.1	163.7	2967.3	4806.4	3219.3	67.0
Green	378.3	15.0	237.3	630.6	0	993.0	630.6	63.5

Table 4. Studies assessing dietary lutein, zeaxanthin and lycopene intakes performed in representative samples of the overall Spanish population.

Year of the survey Sample (N) Spanish general population	Dietary assessment method	FCT used / analytical method	Non-provitamin A carotenoids assessed (µg/p/d)	Reference
1964 (20800 households)	Family Budget surveys	Published food composition data (Olmedilla <i>et al.</i> , 1993, Granado <i>et al.</i> , 1992) / HPLC	Lutein (534.0) Zeaxanthin (108.7) Lycopene (1039.6)	Granado et al 2007
1980 (30311 households)	Family Budget surveys	Published food composition data (Olmedilla <i>et al.</i> , 1993, Granado <i>et al.</i> , 1992) / HPLC	Lutein (676.3) Zeaxanthin (112.5) Lycopene (1414.7)	Granado et al 2007
1990 (21155 households)	Family Budget surveys	Published food composition data (Olmedilla <i>et al.</i> , 1993, Granado <i>et al.</i> , 1992) / HPLC	Lutein (558.0) Zeaxanthin (100.1) Lycopene (1436.6)	Granado et al 2007
2004 (6000 households)	Food consumption survey	Published food composition data (Olmedilla <i>et al.</i> , 1993, Granado <i>et al.</i> , 1992) / HPLC	Lutein (380.1) Zeaxanthin (73.0) Lycopene (1162.7)	Granado et al 2007

Capítulo 3. Efecto del estatus sobre los indicadores funcionales y los objetivos de saludocular.

1. Relationship between macular pigment optical density and contrast sensitivity in two age groups and the influence of dietary and biochemical markers of lutein and zeaxanthin. Nutrition Research (Enviado 8 de Octubre de 2015. Manuscript ID: NR-15-633).

1. Relationship between macular pigment optical density and contrast sensitivity in two age groups and the influence of dietary and biochemical markers of lutein and zeaxanthin. Nutrition Research (Enviado 8 de Octubre de 2015. Manuscript ID: NR-15-633). *Incluido en Capítulo 2.*

DISCUSIÓN INTEGRADORA

DISCUSIÓN INTEGRADORA

La relación entre componentes de la dieta y la salud humana utiliza métodos de valoración de la ingesta dietética y del estatus nutricional. En concreto, respecto a los carotenoides y la salud ocular, interesa el estudio de dos carotenoides sin actividad provitamina A, la luteína y la zeaxantina, por su posible papel en la optimización de la función visual y en la prevención de enfermedades crónicas asociadas a la edad, y de tres carotenoides con actividad provitamina A: β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina, por ser precursores de retinol, nutriente del que depende el ciclo visual para una visión normal. En estos estudios se utilizan biomarcadores del estatus nutricional, que pueden ser modificados por diversos factores (ligados a los alimentos y también al sujeto), así como valoraciones de la ingesta. En la bibliografía en general se encuentran estudios que relacionan la ingesta y el estatus o la ingesta y la función visual o el estatus y la función visual, pero no de forma simultánea los tres tipos de enfoques (dieta, estatus, función visual), tal como se presenta en la presente memoria, en sujetos de características bien definidas y teniendo en cuenta factores de confusión que pueden incidir en el estatus.

En este apartado se discutirán los resultados obtenidos de los diferentes estudios realizados para esta tesis desde los tres enfoques habituales en el contexto dieta y salud y cuyo conocimiento simultáneo puede permitir la toma de decisiones a distintos niveles: 1) el efecto de la **ingesta** de carotenoides sobre marcadores de **estatus** nutricional; 2) el efecto de la **ingesta** de carotenoides sobre **marcadores de salud**; 3) el

efecto del **estatus** nutricional sobre **indicadores funcionales de salud ocular**.

1. Efecto de la ingesta de luteína, zeaxantina y carotenoides provitamínicos sobre el estatus nutricional.

El consumo regular de frutas y hortalizas, según el World Cancer Research Fund (WCRF), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) está asociado con un menor riesgo de numerosas enfermedades no transmisibles como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, y posiblemente diabetes mellitus tipo 2 (WHO/FAO 2003, WCRF 2007, Burrows *et al.* 2015). Entre los distintos componentes de dichos alimentos que han sido identificados como posibles responsables de estas asociaciones se encuentran los carotenoides. Concretamente, la relación entre la ingesta de carotenoides y el riesgo de DMAE (neovascular) fue identificada en un estudio epidemiológico en EEUU en el que se concluyó que un aumento en el consumo de luteína y zeaxantina, presentes en alimentos vegetales de hoja y de color verde oscuro, podrían disminuir el riesgo de desarrollar dicha enfermedad (Seddon *et al.* 1994). Sin embargo, las asociaciones epidemiológicas en este ámbito han sido controvertidas y en cualquier caso, nunca aportan una relación causal. En cambio, en el marco de las enfermedades carenciales, la relación causa y efecto es relativamente fácil de demostrar, así el aporte de carotenoides con actividad provitamínica A permite un aumento de retinol en sujetos con

deficiencia en vitamina A y signos de enfermedad carencial (ej. xeroftalmía) (Pee *et al.* 1998, IOM 2001, Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015).

En los estudios epidemiológicos se utilizan diversas técnicas de evaluación nutricional, entre las que se encuentra la evaluación dietética, la cual nos aportará información cuya precisión y fiabilidad depende, entre otros aspectos, de la calidad de los datos de las Tablas /base de datos de composición de alimentos (ej. en relación con la identificación del alimento, representatividad de la muestra analizada, método analítico aplicado, términos para expresar el contenido de carotenoides, etc) (Granado *et al.* 1997b, Faber *et al.* 2013). Tradicionalmente las TCA se han centrado en el contenido en carotenoides provitamínicos, y lo han expresado como su contenido conjunto bajo diversos términos: β -caroteno , como carotenoides provitamínicos (Moreiras *et al.* 2013) o como su aporte al contenido en vitamina A (ER (AESAN 2006, FAO/LATINFOODS 2009, Moreiras *et al.* 2011) ó EAR (Holden *et al.* 1998, Menchú 2012), pero existen muy pocas que ofrezcan información sobre el contenido de los carotenoides considerados en los estudios relacionados con la salud, que son los 6 carotenoides mayoritarios en sangre: luteína, zeaxantina, licopeno, α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina Y que además los ofrezcan de forma individualizada, y aún menos que ofrezcan el contenido en luteína y zeaxantina por separado (West *et al.* 1993, Holden *et al.* 1998, O'Neill *et al.* 2001).

Debido a que cada vez se publica mayor número de estudios sobre la actividad biológica de los diferentes carotenoides en relación con la salud o

enfermedad (ej. luteína y zeaxantina en función visual, licopeno en relación con sistema cardiovascular), y a las nuevas formas de expresión de la contribución a la vitamina A de los carotenoides provitamínicos, que puedan plantearse en base al conocimiento sobre su biodisponibilidad y conversión en formas activas, resulta fundamental conocer el contenido en carotenoides de manera individual. Una de las principales ventajas de la base de datos desarrollada por nuestro grupo (Beltrán *et al.* 2012) es que ofrece este contenido individualizado y en alimentos consumidos en nuestro país, incluyendo además, para casi todos los alimentos contenido de luteína y zeaxantina de manera individualizada (excepto para algunos de los pocos no analizados por nuestro grupo). También, esta base de datos supone un aumento en la fiabilidad de los datos al utilizarse únicamente datos obtenidos mediante HPLC (especificidad en el análisis) frente a los que existían en la mayoría de las TCA en España, que contienen datos bibliográficos sin, en general, aportar datos sobre la metodología aplicada. Además los alimentos introducidos en ella son aquellos constituyen los aportes principales a la ingesta de carotenoides en Europa (Maiani *et al.* 2009): frutas y hortalizas, mayoritariamente, pero también productos lácteos, aceite de oliva y los huevos porque su consumo cuantitativo en la población española (AESAN 2011) podría influir en la ingesta total de carotenoides. Por su influencia en la biodisponibilidad de carotenoides, se incluyen datos de los alimentos en forma cruda, tras proceso de cocción o procesados industrialmente.

El contenido de carotenoides en alimentos muestra gran variabilidad en general, en cuanto a concentración, no respecto a perfil de compuestos, según diversos factores, unos ligados al alimento (variedad, grado de

madurez, climatología, etc) y otros muchos factores (Rodríguez Amaya 2001), y otros a la metodología de análisis utilizada. Esta variabilidad se refleja en los datos de las TCA /BDCA. Por ello, la utilización de distintas TCA / BD para llevar a cabo evaluaciones dietéticas puede dar lugar a importantes discrepancias en la ingesta de micronutrientes (ej. vitamina A, (Granado *et al.* 1997). Para comparar nuestra base de datos de carotenoides (Beltrán *et al.*, 2012) con una de las tablas de composición de alimentos más utilizadas en España (Moreiras *et al.* 2013) se calculó la ingesta de un grupo de sujetos jóvenes (n=54) con ambas tablas. La utilización de la BD y aplicación informática de carotenoides en alimentos permitió obtener información individualizada de la ingesta de carotenoides y de vitamina A procedente de estos compuestos. En cambio, la TCA de Moreiras *et al* permite el cálculo de la ingesta de retinol, de “carotenos provitamínicos totales” y de vitamina A (únicamente expresada en ER y sin posibilidad de calcular EAR al no disponer de datos individualizados de carotenoides). La ingesta total de vitamina A (expresada como ER) utilizando ambas fuentes de datos fue similar y refleja dietas en las que el retinol preformado (fuentes animales) es el principal componente de la ingesta de vitamina A, como ocurre en otras poblaciones occidentales (Capita *et al.* 2006) (Ortega *et al.* 2003). Sin embargo, en aquellos patrones alimentarios con elevada ingesta de frutas y hortalizas, en cuyo contenido predomine la β -criptoxantina (abundante en frutas), debido al factor aplicado al cálculo de la contribución a la ingesta de EAR, podría dar lugar a la infravaloración de la ingesta de esta vitamina (Burri *et al.* 2011).

A partir de la información contenida en esta base de datos, y con el fin de facilitar su uso para la evaluación de la ingesta de carotenoides se

elaboró una aplicación informática (Estévez-Santiago *et al.* 2013). Aplicable al estudio de la dieta humana, ya que incluye los seis carotenoides habitualmente presentes en sangre y en la dieta de todas las poblaciones, pero también aplicable a otros tipos de estudios (ej. de investigación, en salud humana, agronómicos, sobre biodiversidad, etc) ya que está preparada para incluir información sobre otros carotenoides hasta la fecha menos estudiados pero que en base a su actividad biológica (ej. neoxantina, violaxantina, γ -caroteno, fitoeno y fitoflueno) pueden ser de interés para desarrollos futuros, así como otros que están presentes en las plantas consumidas por la población española (por ejemplo capsantina y capsorrubina en los pimientos, lactucaxantina en lechuga y cucurbitaxantina en calabazas). La posibilidad de consulta que ofrece dicha aplicación informática resulta útil a nivel clínico, porque permite determinar los alimentos que suponen un mayor aporte a la dieta de un carotenoide determinado, con el objetivo de potenciar su consumo para alcanzar las ingestas recomendadas, o también en el ámbito de la agronomía, ya que permite comparar el contenido entre diferentes variedades de una especie para, por ejemplo, seleccionar aquella que aporte una mayor cantidad de carotenoides provitamínicos y promocionar su consumo entre grupos de población en riesgo de deficiencia de vitamina A o aquellos alimentos con mayor contenido de luteína y zeaxantina para ser recomendados a grupos con elevado riesgo de enfermedades oculares asociadas a la edad.

1.1 Marcadores de ingesta de luteína y zeaxantina

En el estudio realizado en un sujetos aparentemente sanos, en dos rangos de edad (20-35 y 45-65 años), en el que se valoraron dos marcadores de estatus de luteína y zeaxantina (concentraciones en suero y densidad óptica de pigmento macular (DOPM) y como marcador de función visual la sensibilidad al contraste (SC), se evaluó también la ingesta dietética. Este es el primer estudio para evaluar simultáneamente los marcadores en la dieta y el estado nutricional de luteína y zeaxantina y las relaciones entre ellos, en sujetos españoles teniendo en cuenta varios factores de confusión (Olmedilla-Alonso *et al.* 2014). A nivel general son escasos los estudios que los incluyen, y además éstos no suelen utilizar muestras homogéneas en cuanto a factores que pueden influir en dicho estatus, como son el sexo, la edad, lípidos séricos y el IMC (Hammond *et al.* 1996, Burke *et al.* 2005, Wenzel *et al.* 2007) . En este apartado se comenta sólo la ingesta dietética de luteína y zeaxantina de estos sujetos (0,45 mg/día), que globalmente fue mucho menor que la ingesta publicada hace diez años para un grupo de sujetos españoles (O'Neill *et al.* 2001) pero semejante a otros estudios españoles (0,5 y 0,1 mg/día de luteína y zeaxantina respectivamente) (Granado *et al.* 1996) y a otros realizados en otras poblaciones (Curran-Celentano *et al.* 2001). También es inferior a la descrita en población estadounidense (National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) (USDA-ARS 2012). Las grandes diferencias en ingesta entre estudios pueden ser, en gran medida, atribuidas a diferencias entre los datos de contenido de las distintas BD o TCA, y al uso de diferentes tipos de encuestas dietéticas (Granado-Lorencio *et al.* 2006). En la muestra de estudio no se encontraron diferencias significativas entre sexos, como se ha

descrito en algunos estudios (Hammond *et al.* 1996) aunque otros indican mayores ingestas en mujeres (Wenzel *et al.* 2007, George *et al.* 2012). Si se encontraron diferencias entre los rangos de edad estudiados, siendo superior el consumo en el grupo con de entre 45 y 65 años, como ocurre en otros estudios (Johnson *et al.* 2010), aunque hay otros que no encuentran diferencias (Cardinault *et al.* 2003). El ratio de ingesta de luteína y zeaxantina en este estudio fue de 11:1 y en población occidental está descrita una relación 7:1 (Beatty *et al.* 2004)

Con el fin de profundizar en estos datos, se realizó el análisis de la ingesta de estas xantofilas a partir de frutas, hortalizas, huevos (Estévez-Santiago *et al.* 2015a), matrices alimentarias muy diferentes que dan lugar a diferente biodisponibilidad de los carotenoides (Pee *et al.* 1998, Maiani *et al.* 2009). Se observó cómo las hortalizas aportan una mayor cantidad de luteína y zeaxantina a la dieta (1080,4 µg/día) que las frutas (53,4 µg/día) y los huevos (143,2 µg/día), no solamente porque se consuman en una mayor cantidad, sino porque la densidad de estos carotenoides por gramo es superior. Sin embargo, aunque la mayor densidad se encuentra en los huevos y derivados, 4 veces mayor que hortalizas, estos se consumen 10 veces menos que las hortalizas y por ello su contribución es menor.

Por otro lado, dado que cada vez un mayor número de agencias y organismos enfatizan en la importancia de la variedad en el color de las frutas y hortalizas consumidas (USDA 2011) debido a que diferentes colores se asocian con diferentes fitoquímicos, lo que implica diversos posibles beneficios para la salud (Heber *et al.* 2001, Oude Griep *et al.* 2011, Thyagarajan *et al.* 2011, Mirmiran *et al.* 2015) también se estudió esta

ingesta a partir de los alimentos clasificados por colores (rojo-anaranjado, blanco-amarillento y verde). Se observó que el aporte a partir de alimentos verdes es mayor (933,4 $\mu\text{g}/\text{día}$) como ocurre en otros estudios (Moeller *et al.* 2009), seguido de los alimentos blanco-amarillentos (199,3 $\mu\text{g}/\text{día}$), y por último los de color rojo-anaranjado (172,6 $\mu\text{g}/\text{día}$). El consumo de alimentos verdes ha sido asociado a una mayor ingesta de estas xantofilas por su mayor contenido en los alimentos clasificados dentro de este grupo (Beltrán *et al.* 2012) y por otra parte, las recomendaciones dietéticas emitidas por gobiernos e instituciones internacionales incluyen el aumento de consumo de alimentos de color verde para aumentar la ingesta de luteína y zeaxantina, entre otras sustancias (USDA 2011).

1.2 Marcadores de estatus (concentración en suero y densidad de pigmento macular)

Como marcadores de estatus de luteína y zeaxantina se estudiaron, las concentraciones en suero de estas xantofilas (marcador de estatus a corto plazo) y la DOPM (marcador de estatus a largo plazo), ya que la presencia de estas xantofilas en sangre y otros tejidos (por ejemplo, en la retina) se han asociado con un menor riesgo de enfermedades relacionadas con la edad (Granado *et al.* 2003, Thurnham 2007b, Shardell *et al.* 2011) y con una mejor función visual (Hammond *et al.* 2014). La determinación de las concentraciones de luteína y zeaxantina en suero ha sido considerada el mejor método disponible para el establecimiento de su estado nutricional en sujetos (Cardinault *et al.* 2003, Carpentier 2009, Lien *et al.* 2011b), aunque estas concentraciones se ven afectadas por factores relacionados

con la dieta y con el individuo, que influyen en su absorción y utilización (Granado *et al.* 2003, Thurnham 2007b).

En la muestra en estudio los niveles de luteína en suero (12,8 µg/dl) son similares a otros españoles (Granado-Lorencio *et al.* 2006) e inferiores (Curran-Celentano *et al.* 2001, Cardinault *et al.* 2003) o similares (Hammond *et al.* 1996, Nolan *et al.* 2007, Renzi *et al.* 2012) a otros realizados en población de Europa y Norte-América. La concentración de luteína en suero del estudio, y prácticamente de todos los mencionados anteriormente no alcanza la concentración que ha sido consistentemente asociada a una disminución de riesgo en estudios epidemiológicos (DMAE y cataratas) y mayores valores de DOPM (aprox. 34 ug/dl; 0,6 umol/l) (Granado *et al.* 2003). La concentración en suero de ambos sexos fue semejante, como ocurre en otros casos (Hammond *et al.* 1996, Olmedilla *et al.* 2001, Cardinault *et al.* 2003, Wenzel *et al.* 2007), y superior en el rango de edad entre 45-65 años. Sin embargo estas diferencias desaparecen al relacionar la concentración sérica de luteína+zeaxantina con la concentración de lípidos sanguíneos,

La DOPM, marcador de estatus nutricional de luteína y zeaxantina a largo plazo en la muestra total tiene un valor de 0,35 (du), similar a otros estudios (Hammond *et al.* 1996, Burke *et al.* 2005, Wenzel *et al.* 2007), sin mostrar diferencias entre sexos y obteniéndose valores superiores en el grupo de menor edad, lo cual concuerda con algunos estudios que indican que esta variable declina con edad (Berendschot *et al.* 2005), pero no con otros en los que no observan diferencias respecto a la edad (Hammond *et al.* 1998). Esta disminución con la edad puede atribuirse a la disminución de

la capacidad de respuesta al consumo de carotenoides (en general la ingesta es mayor en individuos de mayor edad), y, por lo tanto por la captura defectuosa por parte de la retina central de los carotenoides plasmáticos o conversión de luteína en mesozeaxantina (Meagher *et al.* 2013).

1.3 Correlaciones entre ingesta y marcadores de estatus

Las concentraciones séricas y dietéticas de luteína y zeaxantina a menudo se han asociado positivamente con la DOPM (Beatty *et al.* 2004, Thurnham 2007b, Lien *et al.* 2011b), pero están descritos resultados contradictorios al relacionarlos con diversas variables (sexo (Carpentier 2009, Murray 2014), la edad (Carpentier 2009), índice de masa corporal (IMC) (Curran-Celentano *et al.* 2001) y lípidos (Granado-Lorencio *et al.* 2006), entre otros factores.

En nuestra muestra, las correlaciones entre las ingesta dietética de luteína y zeaxantina y su concentración en suero fueron menores ($r > 0,2$) que las que relacionaban estas concentraciones con el consumo (g/día) de frutas y hortalizas, ($r > 0,3$) al igual que ocurre en otros estudios (Hammond *et al.* 1996, Beatty *et al.* 2004, Burke *et al.* 2005, Wenzel *et al.* 2007) (sobre todo para consumo de frutas y sumatorio frutas+hortalizas) siendo llamativo el hecho de que en el grupo de sujetos más jóvenes las correlaciones son mayores que en el grupo de sujetos mayores (Nolan *et al.* 2007), a pesar de que estos últimos tenían una ingesta superior de ambos carotenoides así como unas mayores concentraciones en suero. Este hecho puede ser debido a la influencia de otros factores metabólicos sobre el

metabolismo de las xantofilas, como la captación por los tejidos de luteína y zeaxantina del plasma o alteraciones en su transporte a retina (ej. niveles de lípidos plasmáticos).

Al estudiar la correlación de ingesta de luteína y zeaxantina a partir de frutas y de hortalizas, por separado, con sus concentraciones séricas, se observó un mayor número de correlaciones y con mayor nivel de significación con las xantofilas provenientes de frutas. Esto podría deberse a que los carotenoides presentes en frutas se encuentran en cromoplastos (en forma de gotas oleosas) y parecen ser más fáciles de absorber que cuando están unidos a los cloroplastos, como es el caso de las hortalizas de hoja verde (Jeffery *et al.* 2012). Aunque, algunos autores han descrito mayores correlaciones entre ambos marcadores en hortalizas (Campbell *et al.* 1994), y otros no encontraron correlaciones significativas (Wenzel *et al.* 2007). La falta de correlación con la ingesta de luteína y zeaxantina a partir del huevo resulta sorprendente debido a que la matriz de este alimento y su contenido en grasas, da lugar a una alta bioaccesibilidad de carotenoides (Thurnham *et al.* 1998) aunque quizá podría explicarse por el bajo consumo de este alimento en este estudio comparado con la ingesta media española (Varela-Moreiras G 2010) o por un bajo contenido en los huevos ingeridos por los participantes (Rasmussen *et al.* 2012).

A pesar de que la ingesta de hortalizas de hoja verde, es la que se ha relacionado tradicionalmente con luteína y zeaxantina (Pennington *et al.* 2010), y que en este estudio, los alimentos clasificados en el grupo de color verde, son los que suponen una mayor ingesta de estas xantofilas, sus correlaciones con las concentraciones séricas de luteína y zeaxantina son

muy escasas, como se describe en un estudio que valora la frecuencia de consumo de alimentos de este grupo (Mulokozi *et al.* 2003), sin embargo, su ingesta a partir de alimentos rojo-anaranjados presenta muchas más correlaciones, y más fuertes.

En general, los coeficientes de correlación entre la ingesta de luteína y zeaxantina y sus concentraciones en suero son bajas (Jansen *et al.* 2004), algo que podría ser explicado por la gran variabilidad en el contenido de carotenoides en los alimentos (por ejemplo, post-cosecha, cultivos, preparación de alimentos) (Rodríguez-Amaya 2010), por tener relación con la manera de expresar los datos en las tablas de composición de alimentos (Granado *et al.* 1997b) o con la variabilidad en las respuestas entre individuos (Mares *et al.* 2006, Bunea *et al.* 2014).

Como ya se ha mencionado, la ingesta de luteína y zeaxantina se ha asociado positivamente con la DOPM (Beatty *et al.* 2004, Thurnham 2007b, Lien *et al.* 2011b), sin embargo, en nuestra muestra esta relación no existe. En cambio, sí se asocia la DOPM con la ingesta de frutas y hortalizas, tanto en el grupo de mayor edad, como al considerar la muestra total. Esta fuerte correlación entre la ingesta de frutas y hortalizas y DOPM, también presente en otros estudios (Burke *et al.* 2005), lleva a pensar que no sólo su contenido en luteína y zeaxantina es importante en la función visual, sino que pueden ejercer efecto sobre este parámetro otros micronutrientes o compuestos bioactivos presentes en estos grupos de alimentos (Mares *et al.* 2006).

También se correlacionan las variables séricas (concentraciones de xantofilas y su relación con lípidos plasmáticos) con DOPM en el grupo de

mayor edad, y muestra total, pero mayoritariamente en aquellas variables que consideraban el sumatorio de xantofilas, en relación al sumatorio de lípidos plasmáticos. La razón para estas correlaciones podría ser que la luteína y la zeaxantina son transportados por las LDL y HDL en cantidades similares, y es ampliamente aceptado que las modificaciones oxidativas de éstas lipoproteínas afectan a su metabolismo y, por otra parte, las LDL modificadas pueden tener un efecto sobre las células epiteliales pigmentadas de la retina (Du *et al.* 2013).

Al incluir los tres marcadores nutricionales de luteína y zeaxantina descritos hasta ahora en un análisis multivariable, contemplando además, la posible influencia de sexo, edad, concentración de lípidos séricos, se vio que solamente las concentraciones séricas de luteína y del sumatorio de luteína y zeaxantina en relación con el sumatorio de lípidos plasmáticos influían significativamente en el MPOD. Esta relación se encuentra modificada por edad y sexo en el grupo de sujetos de mayor edad (Olmedilla-Alonso *et al.* 2014).

Un aspecto clave en la relación entre la ingesta y el estatus es la biodisponibilidad, ya que esta determinará la cantidad de cada componente de la dieta que está disponible para ser absorbido y utilizado por los tejidos (Aggett 2010), aunque esta varía en función de la matriz alimentaria ²(Granado-Lorencio *et al.* 2007b, Maiani *et al.* 2009), porque facilitaría por ejemplo el establecimiento de eficaces programas de intervención nutricional. Por ello, se llevó a cabo un estudio sobre la bioaccesibilidad de carotenoides provitamínicos (α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina) de las frutas que aportan mayor cantidad de β -criptoxantina a la dieta española o que tienen un elevado contenido en éste carotenoide (Estévez-

Santiago *et al.* 2015b) y por tanto, en este estudio se considera el papel de los carotenoides en cuanto a su contribución a la presencia de retinol en el ciclo visual. Para esta valoración de la bioaccesibilidad (la cantidad de carotenoide que es liberado de la matriz alimentaria durante la digestión) se utilizó un modelo de digestión *in vitro* recientemente propuesto por Minekus *et al.* (Minekus *et al.* 2014a). Este protocolo, que ha sido adaptado por nuestro grupo para el estudio específico de bioaccesibilidad de carotenoides, se caracteriza principalmente porque la incorporación de enzimas se realiza en base a su actividad y no en base al peso o unidades internacionales como se ha hecho en la mayoría de la bibliografía al respecto (Oomen *et al.* 2003, Granado-Lorencio *et al.* 2007b, Ekesa *et al.* 2012).

En las frutas analizadas se observó que la bioaccesibilidad de β -criptoxantina fue semejante a la de β -caroteno, y ambas, superiores a la de α -caroteno. Existe una amplia variedad de resultados en cuanto a la bioaccesibilidad de estos carotenoides en la bibliografía y entre los factores que en ella influyen, se discutieron aquellos considerados críticos para comparar nuestros resultados: la preparación de la muestra (crudo / cocido / congelado previamente, en presencia o ausencia de aceite / grasa) y las características del protocolo para la evaluación de la bioaccesibilidad.

El procesamiento de la muestra con calor y congelación facilitan la rotura de las estructuras de la matriz del alimento, liberando los carotenoides y aumentando la bioaccesibilidad como puede observarse en muchos estudios (Granado *et al.* 2006, Thakkar *et al.* 2008, Bengtsson *et al.* 2009, Thakkar *et al.* 2009, Bengtsson *et al.* 2010, Svelander *et al.* 2011,

Ekesa *et al.* 2012, Berni *et al.* 2014), con algunas excepciones (Huo *et al.* 2007, Failla *et al.* 2009, Lipkie *et al.* 2013, Failla *et al.* 2014, Berni *et al.* 2015). La adición de grasa a muestra previa a la digestión *in vitro*, también aumenta la bioaccesibilidad (Bengtsson *et al.* 2009, Ekesa *et al.* 2012, Pugliese *et al.* 2014) ya que la produce un ambiente lipofílico que facilita la incorporación de los carotenoides a partir de la matriz del alimento a las gotículas de grasa durante la fase gástrica y además, los productos de la hidrólisis de lípidos modifican las características fisicoquímicas de las micelas, lo cual puede aumentar la incorporación de carotenoides (Huo *et al.* 2007). Respecto a este factor también pueden encontrarse estudios con mayores bioaccesibilidades (Bengtsson *et al.* 2010, Svelander *et al.* 2011, Ekesa *et al.* 2012, Jeffery *et al.* 2012, Berni *et al.* 2014), pero también excepciones (Failla *et al.* 2008, Failla *et al.* 2009, Lipkie *et al.* 2013, Berni *et al.* 2015). Los alimentos analizados en el estudio, en su mayoría frutas, son analizados sin congelado previo, crudos y sin adición de grasa porque es como generalmente (a excepción del pimiento rojo que puede consumirse crudo o cocinado con grasa) suelen consumirse. Aunque el almacenamiento en congelación de las muestras pueda resultar útil para el análisis en el laboratorio de numerosas muestras, estandarizando procedimientos de recolección, no es útil desde el punto de vista nutricional, porque son muy escasas las circunstancias en las que éste grupo de alimentos se consume tras una congelación, y la bioaccesibilidad se verá modificada. Tampoco es frecuente consumir la fruta con una fuente externa de grasa, pero, sí es consumida como postre en una comida que contenga grasa, lo que podría ejercer un efecto positivo en su bioaccesibilidad.

Al comparar los métodos de digestión *in vitro*, la falta de homogeneidad entre ellos es sorprendente, y no sólo en cuanto a las

diferencias entre los protocolos de digestión, sino también entre formas de expresar los resultados (Granado-Lorencio *et al.* 2007a, O'Connell *et al.* 2007, Failla *et al.* 2008, Rodrigo *et al.* 2015). Los principales aspectos que deben ser considerados en el protocolo son las fases de la digestión, su duración, el pH, las enzimas añadidas y sus cantidades. Algunos de ellos omiten la fase oral, pero todos presentan fase gástrica y duodenal, con características relativamente semejantes salvo excepciones (Reboul (Ekesa *et al.* 2012), Hedrén (Bengtsson *et al.* 2010)). Las mayores variaciones entre protocolos se refieren a las enzimas utilizadas en las diferentes fases (especialmente la duodenal) y las concentraciones de estas, siendo en algunos casos 200 veces superiores (O'Sullivan *et al.* 2010) o inferiores (Berni *et al.* 2014) al protocolo consenso. A pesar de ello, no se puede considerar que ninguno de estos factores sea el responsable de las variaciones en los resultados de bioaccesibilidad, ya que se han encontrado tanto resultados semejantes, como superiores e inferiores en aquellos estudios que usaban protocolos parecidos así como en aquellos estudios que utilizaban protocolos muy diferentes al utilizado en este estudio. Además, en un estudio realizado previamente por nuestro grupo aplicando exactamente el mismo protocolo que en este estudio, se obtuvieron bioaccesibilidades para el BC de entre 15 y 43% partir de harina de camote, altas bioaccesibilidades probablemente adjudicables a que la muestral había sido previamente, desecada, triturada y congelada (Estévez-Santiago *et al.* 2015d).

Esta gran variabilidad en la preparación de las muestras, protocolos utilizados, y forma de expresión de los resultados, dificulta sumamente la posibilidad de comparación entre resultados, haciendo necesaria la

estandarización de un protocolo de digestión *in vitro* para análisis de carotenoides, con el fin de limitar el número de variables que influyen en la disparidad de resultados, así como facilitar una información completa y minuciosa sobre la muestra analizada y su tratamiento previo.

2. Efecto de la ingesta de carotenoides sobre marcadores de la salud ocular

La ingesta de diversos componentes de la dieta está ligada al estado de salud, en el caso de nutrientes como la vitamina A, la principal situación que hay que asegurar es cubrir las necesidades nutricionales para evitar la enfermedad carencial (ej. xeroftalmía y ceguera), y cuando se trata de componentes bioactivos, como la luteína y zeaxantina, todavía no considerados nutrientes (o nutrientes bajo ciertas condiciones en relación con la salud visual) (Semba *et al.* 2003), su ingesta busca optimizar la salud y/o disminuir el riesgo de determinadas enfermedades. Una de las opciones para detectar los grupos de población que se beneficiarían con una intervención nutricional es la evaluación dietética. Las intervenciones nutricionales para solucionar deficiencias en micronutrientes son cada vez menos necesarias en el mundo occidental ya que las enfermedades carenciales por deficiencia de micronutrientes están prácticamente eliminadas (OMS 1990), pero no en países en desarrollo donde la deficiencia en vitamina A sigue siendo una de las principales enfermedades carenciales; en cambio, las intervenciones nutricionales más frecuentes buscan obtener una salud óptima, potenciando alguna función del organismo, como puede ser la visual, o disminuyendo el riesgo de una enfermedad crónica (ej. DMAE). Este apartado se centra en la relación entre ingesta de luteína y zeaxantina en relación con la optimización de la función visual en sujetos sin enfermedad ocular y en la ingesta de provitamina A en la población española.

2.1 Ingesta de luteína y zeaxantina en relación con la salud ocular

La agudeza visual podría definirse de una forma general como la medida que describe y cuantifica el grado en el que el sistema visual puede realizar los requerimientos presentados por las tareas visuales (Shcereumder 2014). De entre los procedimientos para valorar la agudeza visual, la sensibilidad al contraste parece ser el más adecuado (Loskutova *et al.* 2013) y, al igual que otros parámetros de función visual, ha sido relacionada con la DOPM (O'Connell *et al.* 2006, Loughman *et al.* 2010, Puell *et al.* 2013), marcador cuyos cambios han sido valorados en relación con la función visual en pocos estudios y que no puede ser considerado como marcador subrogado de función visual (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2012). Aunque está demostrado que el aumento en la ingesta de luteína puede aumentar la DOPM en la mayoría, pero no en todos, los sujetos sanos, (ingesta→estatus) todavía no hay pruebas suficientes que permitan demostrar que un aumento en la DOPM esté relacionado con la visión (estatus→salud) (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2011, 2012) o que el consumo de luteína y zeaxantina esté relacionado con una mejoría en la visión en condiciones de deslumbramiento (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2014) (ingesta→salud).

El método mediante el cual el pigmento macular, mejoraría la sensibilidad al contraste (como medida de la función visual) es la absorción de la luz azul y atenuación de los efectos de la aberración cromática y del efecto adverso de la dispersión de la luz (Hammond *et al.* 1998, Loskutova

et al. 2013). Aunque existen resultados controvertidos, principalmente dependientes de las condiciones de estímulo utilizadas (Rodríguez-Carmona *et al.* 2006, Engles *et al.* 2007, Stringham *et al.* 2007, 2008) y los métodos por los que se estudia la función visual, la mayor parte del creciente número de estudios observacionales y de intervención diseñados para evaluar la relación entre estas dos variables, muestran una relación significativa entre la variación en DOPM y los efectos inmediatos sobre la función visual (Hammond *et al.* 2014) (estatus→salud). Dado que se necesitan más estudios para examinar la relación entre MPOD y función visual, en el estudio sobre marcadores de estatus nutricional de luteína y zeaxantina en sujetos control, en dos rangos de edad (Olmedilla-Alonso *et al.* 2014), se incluyó la determinación de la sensibilidad al contraste, bajo condiciones de presencia o ausencia de deslumbramiento, para valorar su relación con el DOPM (Estévez-Santiago *et al.* 2015c) así como la relación de ésta con marcadores de ingesta (Estévez-Santiago *et al.* 2015a).

Para determinar la SC se utilizó un test que incluía 6 tamaños de estímulo (6 grados de ángulo visual) y 12 niveles de contraste diferentes, a dos niveles de deslumbramiento. Los resultados indicaron que el MPOD y la SC son superiores en el grupo de edad entre 20 y 35 años que en el grupo de mayores (45 - 65 años) (Estévez-Santiago *et al.* 2015c), lo cual apoya los resultados de otros estudios en los que estas variable declina con la edad (Hammond *et al.* 1998). La SC es menor en condiciones de deslumbramiento en ambos grupos de edad, pero con mayor diferencia en el de individuos mayores.

La SC se correlaciona fuertemente con la ingesta de frutas y hortalizas en muestra total en prácticamente todos los tamaños de estímulo con y sin deslumbramiento, pero no con la ingesta de luteína y zeaxantina (Estévez-Santiago *et al.* 2015c), además la ingesta de estos grupos de alimentos constituye el único predictor de SC en el grupo de 20-35 años, lo cual sugiere que, aunque la ingesta de frutas y hortalizas se puede considerar buen marcador de la ingesta de estas xantofilas (Martini *et al.* 1995, Thurnham *et al.* 1998), la relación de estos alimentos con la función visual, parece estar relacionada, además, con otros micronutrientes y fitoquímicos presentes en ellos.

La ingesta de frutas hortalizas y huevos, mayores contribuyentes a la ingesta de luteína y zeaxantina, ha sido asociada con la DOPM (Pee *et al.* 1998, Ciulla *et al.* 2001, Mares *et al.* 2006). La asociación con la ingesta de frutas y hortalizas se ve apoyada por los resultados de nuestro estudio, no siendo así la de la ingesta de huevos, por las posibles causas ya mencionadas. Hasta el momento, no hemos encontrado estudios que relacionen la ingesta de luteína y zeaxantina a partir de estos grupos de alimentos con la DOPM, que permitan determinar dicha asociación es debida a su contribución a la ingesta de estas xantofilas. Por ello, se realizó este análisis en los sujetos en estudio y se observó que la relación entre la luteína y zeaxantina aportadas por frutas con la DOPM era mayor a la aportada por hortalizas, y que no existe correlación significativa con las aportadas por los huevos. En este contexto, un estudio epidemiológico que estudia la ingesta de frutas y hortalizas, determinó que la ingesta de las primeras pero no de las segundas se asoció a menor riesgo de DMAE (Cho *et al.* 2004). Las posibles razones de que este grupo tenga mayor correlación

con DOPM, cuando los huevos son los que mayor densidad de luteína y zeaxantina tienen por gramo, y las hortalizas las que mayor contenido aportan a la dieta, puede encontrarse en una mayor biodisponibilidad a partir de frutas. Esta mayor bioaccesibilidad puede deberse a que las xantofilas suelen encontrarse formando ésteres en las frutas y según algunos autores (Olmedilla-Alonso *et al.* 2008), aunque no todos (Bunea *et al.* 2014), esta forma química tiene mayor biodisponibilidad. Por otro lado, aunque no está claramente definida la influencia sobre la bioaccesibilidad o biodisponibilidad de la estructura en la que se almacenan los carotenoides (Schweiggert *et al.* 2012), en las frutas suelen encontrarse en cromoplastos y son más eficientemente liberadas que de las hortalizas verdes, en las que se encuentran almacenados en cloroplastos (Pee *et al.* 1998, Cheng *et al.* 2005, Schweiggert *et al.* 2012).

A pesar de que los alimentos clasificados en el grupo de color verde contribuyen en mayor medida a la ingesta de luteína y zeaxantina, las ingestas de estas xantofilas a partir de alimentos clasificados en el grupo de alimentos de color rojo-anaranjado tienen una mayor influencia sobre la DOPM (Estévez-Santiago *et al.* 2015a). Sin embargo, esta mayor influencia es atribuible a la fuerte relación entre las ingestas a partir de alimentos rojo-anaranjados y a partir de frutas, (la mayoría de los alimentos rojo-anaranjados son frutas), como se ha mencionado anteriormente, hay una fuerte influencia de este grupo de alimentos sobre la DOPM.

2.2 Ingesta de carotenoides en relación con la salud de la población española

2.2.1 Luteína y zeaxantina

La actividad biológica de los carotenoides y el aumento en el número de estudios en humanos que involucran a estos compuestos en las últimas décadas (Krinsky *et al.* 2005, Fiedor *et al.* 2014) destacan la importancia del conocimiento de la contenido de carotenoides individuales en alimentos para una mejor comprensión de su papel en la relación entre dieta y salud. Sin embargo, hasta la fecha, la ingesta específica de estos compuestos en relación con el estado de salud se evalúa a nivel de población en sólo unos pocos países (por ejemplo, NHANES en the USA) (USDA-ARS 2012) y España no está entre ellos. Además la comparación entre los estudios que la evalúan es difícil debido principalmente a diferencias metodológicas en cuanto a recogida de datos y tablas /bases de datos de composición de alimentos (BDCA) utilizadas.

Con el fin de conocer la ingesta de luteína y zeaxantina por parte de la población española, así como sus principales fuentes dietéticas, se llevó a cabo este estudio utilizando la reciente Encuesta Nacional de Ingesta Dietética en España (2009-2010) (AESAN 2011), que es la primera encuesta a nivel nacional en España, que utiliza datos de ingesta individual, y los datos de composición de alimentos de la BDCA desarrollada por nuestro grupo (Beltrán *et al.* 2012).

Luteína y zeaxantina son aportadas mayoritariamente por el grupo de frutas y hortalizas (68%) siendo el aporte de la primera a partir de estos grupos, muy superior al de la zeaxantina (500,3 µg/día vs 54,8 µg/día). La suma de total de ellas (incluyendo los datos de ingesta a partir de alimentos de los cuales se conoce el contenido conjunto de luteína+zeaxantina) es de 840,1 µg/día y es superior a la del estudio llevado a cabo en 2004 por granado *et al.* (453,1 µg/día)(Granado *et al.* 2007a), uno de los dos únicos estudios llevados a cabo a nivel poblacional en España sobre el consumo de carotenoides no provitamínicos. Éste fue realizado en base a la valoración

del consumo de alimentos realizado por el Ministerio de Agricultura en 2004, utilizando datos de composición de alimentos incluidos en la BDCA utilizada en el presente estudio (Beltrán *et al.* 2012), y considerando únicamente la ingesta a partir de frutas y hortalizas frescas (Granado *et al.* 2007a). El aumento en el consumo de luteína y zeaxantina reflejado en nuestro estudio frente al publicado en 2007 puede deberse, en parte, a la consideración de una mayor número de alimentos ya que el de Granado *et al.* solamente incluían los alimentos frescos que eran contribuyentes mayoritarios, y como se deduce de los resultados de nuestro estudio, fuentes con escaso consumo (<1g y 1-3g/día) pueden aportar cantidades luteína y zeaxantina (293,9 µg/día) superiores a la aportada, por ejemplo por las espinacas (182,7 µg/día), que junto con las coles, son los mayores contribuyentes.

El aporte de luteína y zeaxantina por parte de otros grupos de alimentos no considerados en el estudio de Granado *et al.* pero sí en este: huevos y derivados y aceites y grasas, supone un 21,7% del aporte total de la dieta. Siendo el aporte a partir de este último, más importante (16,5% vs 5,2%) y producido únicamente por el aceite de oliva. A pesar de la importancia de este alimento en la ingesta de luteína y zeaxantina de la población española, no se debe olvidar su alta densidad calórica frente a la de las frutas y hortalizas (20 veces superior), y se debe seguir recomendando la ingesta de frutas y hortalizas como fuentes de estos carotenoides.

La ingesta dietética de frutas y hortalizas en este estudio (392 g/día: 213 g/día de frutas y 179 g/día de hortalizas [con exclusión de patatas y

tubérculos]) cumple con las cantidades recomendadas por la OMS (400 g/día)(WHO/FAO 2003) pero no con las recomendadas por la World Cancer Research Fund International (WCRF 2007) (600 g/día) incluyendo diferentes colores. Respecto a esto, las diferentes distribuciones de estos carotenoides en frutas y hortalizas agrupados de acuerdo a su color apoya la necesidad de explicar a la población en general los beneficios derivados de las dietas que incluyen no sólo una gran cantidad de frutas y verduras, sino también que estos alimentos deben ser de una variedad de colores (Heber *et al.* 2001), algo recomendado también por otras organizaciones (WCRF 2007, USDA 2011) y se utiliza como un índice de calidad de la dieta (Vadiveloo *et al.* 2014, Vadiveloo *et al.* 2015).

Por último, aunque no existen ingestas dietéticas de referencia para los componentes bioactivos, en base a diferentes tipos de estudios y a las actividades biológicas de estos compuestos existen sugerencias sobre los niveles de ingesta que podrían disminuir el riesgo de varias enfermedades crónicas. Para la luteína se ha sugerido una ingesta de 6 mg/día (Granado *et al.* 2003), la cual es muy superior a la de la población española, que representaría sólo el 14% de dicha cantidad.

2.2.2 Carotenoides provitamínicos.

La ingesta de carotenoides y de vitamina A en poblaciones está determinada generalmente por un reducido número de alimentos (ej. Granado *et al.*, 1996, O'Neill *et al.* 2001) (Granado *et al.* 1996, O'Neill *et al.* 2001). Para realizar el estudio de bioaccesibilidad de β -criptoxantina en alimentos con elevado contenido en dicho carotenoide y que fuesen principales contribuyentes a su ingesta en la población española, se

actualizó el estudio sobre los alimentos principales contribuyentes a la ingesta de carotenoides en la dieta española (Granado *et al.* 2007a) y se amplió el estudio a la ingesta de vitamina A, utilizando la reciente Encuesta Nacional de Ingesta Dietética en España (2009-2010) (AESAN 2011).

Para ello se utilizó la aplicación informática desarrollada por nuestro grupo (Estévez-Santiago *et al.* 2013) basada en la BD publicada previamente (Beltrán *et al.* 2012) para determinar la ingesta dietética de vitamina A, valorando de forma individualizada sus componentes (retinol, α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina) (Beltran-de-Miguel *et al.* 2015). Puesto que el informe ENIDE solo se aportan datos de vitamina A como valor total (no de componentes de este nutriente), sólo fue posible comparar esos datos de ingesta con los de nuestro estudio, obteniéndose que ambos valores son muy semejantes (735 μg de RE y 717 μg de RE), y que además ambas cubren las recomendaciones de ingesta emitidas por la FESNAD (700 y 600 μg de RE para hombres y mujeres (FESNAD 2010). Ninguna de ellas cubre las publicadas en las TCA de Moreiras (1000 y 800 μg de RE para hombres y mujeres) (Moreiras *et al.* 2013), razón por la cual la AESAN, indica que la ingesta de vitamina A no es satisfactoria, especialmente en hombre, ya que es menor del 80% de la cantidad recomendada (AESAN 2012)

En población española, al igual que en otras poblaciones occidentales (O'Neill *et al.* 2001) la vitamina A es aportada principalmente (57,9%) en forma de retinol preformado (415 $\mu\text{g}/\text{día}$) a partir de leche y derivados y de la carne y derivados, coincidiendo con los grupos que suponen mayor aporte en Europa (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015), aunque esta ingesta no alcanza por sí sola a las IR (FESNAD 700-600

ER/día) (FESNAD 2010), incluso en este tipo de sociedades donde los alimentos animales están altamente disponibles. Para ello es necesario el consumo a partir de carotenoides provitamínicos, aportados fundamentalmente por frutas y hortaliza. La ingesta de estos carotenoides en población española (1 845,3 mg / persona / día) es similar a la calculada por Granado et al. utilizando encuestas de presupuestos familiares realizadas entre 1990-1991 (1 619 mg / persona / día) (Granado *et al.* 1996) y en 2004 (1 638,8 mg / persona / día) (Granado *et al.* 2007a). De ellos, el ingerido en mayor cantidad es el β -caroteno (1514,6 μ g/día) seguido de la β -criptoxantina (322,4 μ g/día) y, por último, el α -caroteno (269,2 μ g/día), cuya ingesta, en comparación con datos de 2004 (Granado *et al.* 2007a), es semejante respecto a β -criptoxantina y a α -caroteno, pero superior en cuanto al β -caroteno. En comparación con datos de ingesta en población estadounidense (USDA-ARS 2012), son similares las ingestas de β -caroteno y α -caroteno, pero la ingesta de β -criptoxantina es superior en población española.

Las fuentes de estos carotenoides provitamínicos en la población española son en su mayoría (71,2%): zanahoria, espinaca, tomate y naranja (zumو y fresca) coincidiendo con las principales fuentes en Europa entre las que además se incluyen batata, calabaza, pimiento rojo, mango y melón, y no lo tiene, sin embargo, la naranja (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies 2015). Sin embargo, consideramos importante destacar la contribución de otros vegetales, cuyo consumo en algunos casos varía entre 1 y 3 g / día o incluso menos, pero, que considerados en conjunto (18 g / día), proporcionan una mayor cantidad de carotenoides provitamínicos que alimentos como espinaca, lo cual apoya la idea de que

el consumo de una variedad de alimentos de un grupo determinado hace que sea más probable que la ingesta de nutrientes sea lo suficientemente alta como para cumplir las recomendaciones (Beltran-de-Miguel *et al.* 2015)

Al considerar la ingesta de vitamina A a partir de grupos de alimentos (Moreiras *et al.* 2013), se observa que al expresar la ingesta en EAR, esta vitamina es aportada por leche y derivados (24,8%) y por carne y derivados y por frutas y hortalizas (ambos grupos en porcentajes similares, 23-24%). En cambio, si la vitamina A se expresa en ER, las frutas y hortalizas representan el principal aporte (37,7%), estando a continuación la leche y derivados y la carne y derivados (18-20%) y finalmente, los huevos (9%), Estos porcentajes son muy diferentes a los publicados por la AESAN (AESAN 2012) expresados en ER: huevos (26%), frutas y hortalizas 23% y leche y derivados 15%, no encontrándose razón aparente para esta diferencia.

3. Efecto del estatus de luteína y zeaxantina sobre los indicadores funcionales de salud ocular

El pigmento macular ha sido objeto de numerosos estudios en los que un incremento en su densidad se relaciona con una mejoría en la función visual (O'Connell *et al.* 2006, Loughman *et al.* 2010, Puell *et al.* 2013) y un bajo nivel de pigmento macular es un factor de riesgo, modificable, de DMAE . El pigmento macular (PM) optimiza la función visual en los ojos sanos al absorber la luz azul y por tanto, atenuar los efectos de la aberración cromática y de la dispersión de la luz (Hammond *et al.* 1998, Loskutova *et al.* 2013). Diferentes tipos de estudios muestran como el PM pueden mejorar la función visual, por ejemplo mediante suplementación con luteína a pacientes con cataratas (Olmedilla *et al.* 2003) o en estadios iniciales de DMAE (Richer *et al.* 2004, Puell *et al.* 2013) y en sujetos control (Lien *et al.* 2011b), todos los cuales informan de una mejoría en la agudeza visual y en la reducción de la sensibilidad ante el deslumbramiento. Esta mejoría en el efecto funcional es consistente con el aumento en la densidad de PM (Richer *et al.* 2004), aunque la relación entre PM y agudeza visual es a veces controvertida, principalmente por las condiciones de estímulo utilizadas (Rodriguez-Carmona *et al.* 2006, Engles *et al.* 2007, Stringham *et al.* 2007, 2008) y las formas en las que se mide la función visual.

Por todo ello, uno de los objetivos fue determinar la relación entre MPOD y SC considerando la influencia de la concentración de luteína y zeaxantina en suero y la ingesta de frutas y hortalizas, ya que ambas variables mostraron una relación significativa con la MPOD. En sujetos

control (muestra total y sujetos de mayor edad) hemos observado correlaciones significativas entre la DOPM y la SC en casi todos los tamaños de estímulo, con y sin deslumbramiento (Estévez-Santiago *et al.* 2015c), lo cual concuerda con lo descrito por otros autores (Hammond *et al.* 1998, Loughman *et al.* 2010), aunque es difícil de entender porque el grupo de mayor edad tenía una menor DOPM, pero a su vez, mayores concentraciones de luteína y zeaxantina en suero y en la ingesta. Por otro lado, las diferencias entre las concentraciones de lípidos en suero podrían ser un factor determinante en la relación entre MPOD y SC. La DOPM muestra correlación con los niveles séricos de luteína+zeaxantina en relación a los lípidos plasmáticos en ambos grupos de edad y aunque tanto jóvenes como mayores tenían valores dentro del rango de normalidad de lípidos plasmáticos, los mayores tenían valores significativamente mayores de colesterol total y LDL, lo cual puede influir en el transporte a tejidos (estas xantofilas son transportadas por HDL y LDL en sangre), y por otro lado, tanto las modificaciones oxidativas de estas lipoproteínas, que pueden afectar a su metabolismo (Du *et al.* 2013), como las variaciones en los receptores de lipoproteínas, que pueden ser selectivas para diferentes ratios de LDL/HDL, pueden tener un efecto sobre las células epiteliales pigmentadas. Por otra parte, otros autores han observado correlaciones significativas entre la variación en MPOD y un consiguiente efecto sobre la función visual (Hammond *et al.* 2013), pero los resultados entre estudios son difíciles de comparar al no existir un *gold-estandar* para evaluar el rendimiento visual (Loughman *et al.* 2010) y por tanto, se desconoce en qué medida se puede considerar a la DOPM como un marcador sustitutorio del objetivo final, que sería una mejoría en la función visual (o una disminución del riesgo de determinadas enfermedades oculares asociadas a la edad).

El marcador de estatus de luteína a corto plazo (luteína en suero) muestra correlaciones con SC en el grupo de mayor edad, como ocurre en otros estudios (Hammond *et al.* 1996, Hammond *et al.* 2013), y cuando estas concentraciones se relacionan con los lípidos plasmáticos, también existe correlación en el grupo de jóvenes, sin embargo en la muestra total, no se relaciona la SC con ningún marcador sanguíneo.

Se determinaron los predictores de SC observándose que en sujetos más jóvenes, solamente la ingesta de frutas y hortalizas parece influir en este parámetro mientras en la muestra total, el marcador de estatus a corto plazo luteína en suero y a largo plazo, MPOD parecen tener influencia sobre SC, y en mayores, además el sexo.

Estos resultados, asociados a que en general es común encontrar resultados que afirman que SC disminuye con la edad (Hammond *et al.* 1998), nos indican que, en la juventud la SC no depende de los niveles de luteína y zeaxantina en suero y de la DOPM, pero cuando los sujetos aumentan de edad, y el SC tiende a disminuir, estos niveles de estatus de luteína y zeaxantina sí que influyen en la función visual, es decir, es esperable que, dentro de los mayores, los que mayor concentración de estas xantofilas en suero y DOPM tengan, sean los que tengan también mayor SC. Lo cual puede servir de punto de partida para campañas de promoción del consumo de estas xantofilas, ya que este rango de edad sería la población diana para una mejora de la función visual por dieta dado que, además un aumento de ingesta de frutas y hortalizas o suplementos han

mostrado aumentar las concentraciones séricas de luteína y el MPOD, sin efectos adversos en las concentraciones utilizadas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA.- La base de datos de carotenoides en alimentos y la aplicación informática generados en este trabajo constituyen herramientas específicas y precisas para la consulta de la concentración de los principales carotenoides, con y sin actividad provitamínica A, presentes en los alimentos y en el organismo humano, así como para el cálculo de su ingesta. Estos aspectos son esenciales en los estudios sobre dieta y salud, que requieren información individualizada del contenido de carotenoides en alimentos para permitir una valoración más precisa y adecuada del estado nutricional en vitamina A (expresándola como ER, EAR o en otras formas de expresión futuras que incluyan nuevos datos sobre biodisponibilidad), así como de las actividades biológicas que todos ellos pueden ejercer, en mayor o menor grado, en el organismo humano, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas.

La posibilidad de consulta que ofrece dicha aplicación informática resulta útil a nivel clínico, porque permite determinar los alimentos que suponen un mayor aporte a la dieta de un carotenoide determinado, con el objetivo de potenciar su consumo para alcanzar las ingestas recomendadas, o también en el ámbito de la agronomía, ya que permite comparar el contenido entre diferentes variedades de una especie para, por ejemplo, seleccionar aquella que aporte una mayor cantidad de carotenoides provitamínicos y promocionar su consumo entre grupos de población en riesgo de deficiencia de vitamina A o aquellos alimentos con mayor contenido de luteína y zeaxantina para ser recomendados a grupos con elevado riesgo de enfermedades oculares asociadas a la edad.

SEGUNDA.- Del estudio en marcadores de estatus de luteína y zeaxantina y de función visual en sujetos control, en dos grupos de edad, se deduce que:

- La densidad óptica de pigmento macular (marcador de estatus a largo plazo) muestra correlaciones, dependientes de la edad, con la luteína y zeaxantina en suero expresadas en relación con la concentración de lípidos en suero, así como con la ingesta de frutas y

hortalizas. Por tanto, los rangos de referencia (o de normalidad) para las concentraciones séricas de luteína y zeaxantina se deberían establecer según rangos de edad y expresar su concentración en relación con la de los lípidos séricos, al menos en los sujetos con edad superior a 45 años, ya que puede influir en la densidad óptica de pigmento macular (DOPM).

- Los marcadores predictores de la sensibilidad al contraste (marcador de función visual), con y sin deslumbramiento, son diferentes según la edad de los sujetos. En el grupo de mayor edad (45-65 años) la sensibilidad al contraste (SC) tiene como predictores la DOPM y la concentración sérica de luteína, en cambio, en el grupo de jóvenes (20-35 años) la SC sólo se asocia a la ingesta de frutas y hortalizas.

- La contribución de hortalizas a la ingesta dietética de luteína y zeaxantina es más de siete veces mayor que la de los huevos y casi veinte veces mayor que la de las frutas. Respecto a sus colores, los principales contribuyentes a la ingesta de luteína y zeaxantina son los alimentos de color verde de origen vegetal, seguidos de los de color rojo /anaranjado y de los de color blanco / amarillento. Sin embargo, los alimentos de color rojo /anaranjado, color muy relacionado con la ingesta de frutas, son los que muestran una mayor correlación con las concentraciones séricas de luteína y zeaxantina, en el grupo de sujetos estudiados, y los que tienen una mayor influencia en la DOPM.

TERCERA.- La ingesta dietética de carotenoides en la población española, realizada en base a los datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (2009-2010), indica que:

- La cantidad de luteína y zeaxantina ingerida a partir de fuentes naturales representa un 14% de la cantidad generalmente asociada a una disminución de riesgo de diversas enfermedades crónicas (6 mg/día).

- La ingesta de vitamina A en (716 mg ER) cubre la ingesta recomendada por la FESNAD (2010) y se ajusta al requerimiento medio estimado por el IOM (2001) para población norteamericana. Esta ingesta en población española puede estar infravalorada ya que

ENIDE no recogió información sobre consumo de alimentos comerciales fortificados /enriquecidos con vitamina A (principalmente en forma de carotenoides)

- La vitamina A en población española es aportada por alimentos de origen animal (retinol) en mayor proporción (58% ER) que por alimentos de origen vegetal (carotenoides con actividad provitamínica A) (42% ER), de los cuales la mayoría son aportados por frutas y hortalizas (37% ER). En concreto, los principales contribuyentes a la ingesta de carotenoides provitamínicos (> 70%) son tres hortalizas (zanahorias, tomates, espinacas) y una fruta (naranjas). Al considerar frutas y hortalizas agrupadas por colores, las de color rojo / anaranjado son las que más provitamina A aportan a la dieta. El β -caroteno es el carotenoide mayoritario en la dieta (72% de los carotenoides provitamínicos) y en menor cantidad se ingieren α -caroteno y β -caroteno (15% y 13%, respectivamente).

- Los datos de ingesta individual de los componentes de la vitamina A (retinol, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina) y de carotenoides no provitamínicos, así como la identificación de sus principales fuentes alimentarias, contribuyen a un mejor conocimiento de la relación dieta y salud en relación con aspectos nutricionales y también respecto a varias enfermedades crónicas, y por tanto, facilitan la toma de decisiones sobre intervenciones nutricionales en el ámbito de la salud pública.

CUARTA.- El estudio de la bioaccesibilidad, como factor clave entre la ingesta y absorción de componentes de la dieta, se estudió en frutas adaptando la metodología de consenso internacional recientemente publicada al análisis de carotenoides. La bioaccesibilidad de los carotenoides provitamínicos fue sorprendentemente baja (<10%), pero comparable a la obtenida en otros estudios con alimentos bajo condiciones similares. La bioaccesibilidad de β -criptoxantina fue similar a la del β -caroteno en la mitad de los alimentos analizados (tres) y mayor que la del α -caroteno en otros tres. Esta bioaccesibilidad de la β -criptoxantina cuestiona la baja contribución a la ingesta de vitamina A que se le asigna mediante los cálculos de ER y de EAR, en comparación con el β -caroteno.

QUINTA.- La contribución de los carotenoides provitamínicos a la ingesta de vitamina A debería ser revisada porque dicha ingesta, expresada en equivalentes de actividad de retinol (EAR) o en equivalentes de retinol (ER) considera una menor contribución de β -criptoxantina y α -caroteno respecto a la de β -caroteno (en base a estructura química y datos de biodisponibilidad de β -caroteno), pero en base a algunos de los resultados de este trabajo dicha contribución puede ser cuestionada: a) la bioaccesibilidad de β -criptoxantina es igual o mayor que la del β -caroteno en varios de los alimentos analizados y también diferente a la del α -caroteno; b) en el estudio en población española, los alimentos de origen vegetal son los principales contribuyentes a la ingesta de vitamina A cuando esta es expresada como ER, pero son los segundos contribuyentes si la vitamina A se expresa como EAR; c) los alimentos de color rojo/anaranjado (son principalmente frutas) son los principales contribuyentes a la ingesta de vitamina A de la población española, son los alimentos vegetales con mayor contenido en β -criptoxantina, que en este estudio ha mostrado ser más (o igual) bioaccesible que el β -caroteno y también, muestran una mayor biodisponibilidad de luteína y zeaxantina en relación con la DOPM en sujetos control.

CONCLUSIÓN GENERAL

En consonancia con los objetivos planteados, cabe señalar que en el presente trabajo se han aportado herramientas específicas y fiables que facilitan la información sobre el contenido individualizado de carotenoides en alimentos y en la dieta humana, que han sido aplicadas en los estudios observacionales y de bioaccesibilidad realizados.

El estatus nutricional de luteína y zeaxantina se debería expresar en relación con la concentración de lípidos en suero y en el establecimiento de rangos de referencia de dicho estatus se debe considerar la edad de los sujetos. En el estatus nutricional de luteína y zeaxantina influye el tipo de matriz alimentaria (hortalizas vs frutas) más que la concentración de estos carotenoides los alimentos. Este estatus nutricional es predictor de la agudeza visual (sensibilidad al contraste) en sujetos mayores de 45 años.

La bioaccesibilidad de β -criptoxantina y α -caroteno en comparación con la del β -caroteno, junto con otros datos en los estudios observacionales, parecen indicar que la

contribución de estos carotenoides provitamínicos a la ingesta de vitamina A es mayor de la actualmente establecida (mediante ER, EAR), la cual debería ser revisada.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Aencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN, Base Española de Datos de Composición de Alimentos (BEDCA) 2006
- Aencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN, Datos de consumo de alimentos (gramos/día) a partir del estudio ENIDE 2011
- Aencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN, Evaluación nutricional de la dieta española. I. Energía y macronutrientes. Sobre datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE) 2012
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation Environnement Travail Table Ciqual 2012. French Food Composition Table.
- Aggett, P J. Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 91(5): 1433S-1437S.
- Al-Delaimy, W K, Ferrari, P, Slimani, N and al, e. Plasma carotenoids as biomarkers of intake of fruits and vegetables: individual- level correlations in the European prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) *Eur. J. Clin. Nutr.* 2005: 1387-1396.
- ALCE Ingeniería, S L (2012). DIAL software for assessing diets and food calculations. L.-S. A. Ortega RM, Andrés P, Requejo AM, Aparicio Vizuet A, Molinero LM. Departamento de Nutrición (UCM).
- Baldrick, F R, Woodside, J V, Elborn, J S, Young, I S and McKinley, M C. Biomarkers of Fruit and Vegetable Intake in Human Intervention Studies: A Systematic Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011; 51(9): 795-815.
- Beatty, S, Koh, H H, Henson, D and Boulton, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 2000; 45(2): 115-134.
- Beatty, S and Nolan, J. Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. *Arch. biochem. biophys.* 2004; 430: 70-76.
- Beltran-de-Miguel, B, Estevez-Santiago, R and Olmedilla-Alonso, B. Assessment of dietary vitamin A intake (retinol, alpha-carotene, beta-carotene, beta-

- cryptoxanthin) and its sources in the National Survey of Dietary Intake in Spain (2009-2010). *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2015; 66(6): 706-712.
- Beltrán, B, Estévez, R, Cuadrado, C, Jiménez, S and Olmedilla Alonso, B. Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; Utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutr. Hosp.* 2012; 27(4): 1334-1343.
- Bengtsson, A, Alminger, M L and Svanberg, U. In Vitro Bioaccessibility of beta-Carotene from Heat-Processed Orange-Fleshed Sweet Potato. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(20): 9693-9698.
- Bengtsson, A, Brackmann, C, Enejder, A, Alminger, M L and Svanberg, U. Effects of Thermal Processing on the in Vitro Bioaccessibility and Microstructure of beta-Carotene in Orange-Fleshed Sweet Potato. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58(20): 11090-11096.
- Berendschot, T T and van Norren, D. On the age dependency of the macular pigment optical density. *Exp. Eye Res.* 2005; 81(5): 602-609.
- Berni, P, Chitchumroonchokchai, C, Canniatti-Brazaca, S G, De Moura, F F and Failla, M L. Impact of Genotype and Cooking Style on the Content, Retention, and Bioaccessibility of beta-Carotene in Biofortified Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Conventionally Bred in Brazil. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62(28): 6677-6686.
- Berni, P, Chitchumroonchokchai, C, Canniatti-Brazaca, S G, De Moura, F F and Failla, M L. Comparison of Content and In vitro Bioaccessibility of Provitamin A Carotenoids in Home Cooked and Commercially Processed Orange Fleshed Sweet Potato (*Ipomea batatas* Lam). *Plant Foods Hum. Nutr.* 2015; 70(1): 1-8.
- Bernstein, P S, Delori, F C, Richer, S, van Kuijk, F J M and Wenzel, A J. The value of measurement of macular carotenoid pigment optical densities and distributions in age-related macular degeneration and other retinal disorders. *Vision Res.* 2010; 50(7): 716-728.
- Bone, R A, Landrum, J T and Tarsis, S L. PRELIMINARY IDENTIFICATION OF THE HUMAN MACULAR PIGMENT. *Vision Res.* 1985; 25(11): 1531-1535.
- Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 1995; 9(15): 1551-1558.

- Britton, G (2008). Functions of Intact Carotenoids. Carotenoids. B. V. Basel.
- Britton, G (2009). Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health, Birkhäuser Verlag Basel.
- Bunea, A, Socaciu, C and Pintea, A. Xanthophyll Esters in Fruits and Vegetables. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 2014; 42(2): 310-324.
- Burke, J D, Curran-Celentano, J and Wenzel, A J. Diet and serum carotenoid concentrations affect macular pigment optical density in adults 45 years and older. *J. Nutr.* 2005; 135(5): 1208-1214.
- Burri, B J. Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. *J. Sci. Food Agric.* 2015; 95(9): 1786-1794.
- Burri, B J, Chang, J S and Neidlinger, T R. b-Cryptoxanthin- and a-carotene-rich foods have greater apparent bioavailability than b-carotene-rich foods in Western diets. *Brit. J. Nutr.* 2011; 105: 212-219.
- Burrows, T L, Hutchesson, M J, Rollo, M E, Boggess, M M, Guest, M and Collins, C E. Fruit and Vegetable Intake Assessed by Food Frequency Questionnaire and Plasma Carotenoids: A Validation Study in Adults. *Nutrients* 2015; 7(5): 3240-3251.
- Campbell, D R, Gross, M D, Martini, M C, Grandits, G A, Slavin, J L and Potter, J D. PLASMA CAROTENOIDS AS BIOMARKERS OF VEGETABLE AND FRUIT INTAKE. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 1994; 3(6): 493-500.
- Capita, R and Alonso- Calleja, C. Evaluation of vitamin and mineral intakes and impact of snack foods on Spanish Population. *Nutr. Res.* 2006; 26: 255-265.
- Carbajal Azcona, Á. Manual de Nutrición y Dietética. 2015, from <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-30-cap-15-estado-nutricional.pdf>.
- Carbonell-Capella, J M, Buniowska, M, Barba, F J, Esteve, M J and Frigola, A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2014; 13(2): 155-171.
- Cardinault, N, Gorrard, J-M, Tyssandier, V, Grolier, P, Rock, E and Borel, P. Short-term supplementation with lutein affects biomarkers of lutein status similarly in young and elderly subjects. *Exp. Gerontol.* 2003; 38: 573–582.

- Carpentier, S. Associations between Lutein, Zeaxanthin, and Age-Related Macular Degeneration: An Overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2009; 49: 313-326.
- CDC. (2008). A / E / Carotene Vitamin Profile in Serum NHANES 2003-2004 from http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_03_04/l45vit_c_met_vitAE_carotenoids.pdf.
- CESNID, C d E S d N i D (2009). Tablas de composición de alimentos/Taules de composició d'aliments. Barcelona, Mc-Graw-Hill, Interamericana
- Ciulla, T A, Curran-Celantano, J, Cooper, D A, Hammond, B R, Danis, R P, Pratt, L M, Riccardi, K A and Filloon, T G. Macular pigment optical density in a midwestern sample. *Ophthalmology* 2001; 108(4): 730-737.
- Curran-Celentano, J, Hammond, B R, Ciulla, T A, Cooper, D A, Pratt, L M and Danis, R B. Relation between dietary intake, serum concentrations, and retinal concentrations of lutein and zeaxanthin in adults in a Midwest population. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 74(6): 796-802.
- Cheng, C Y, Chung, W Y, Szeto, Y T and Benzie, I F F. Fasting plasma zeaxanthin response to *Fructus barbarum* L. (wolfberry; Kei Tze) in a food-based human supplementation trial. *Brit. J. Nutr.* 2005; 93(1): 123-130.
- Chitchumroonchokchai, C and Failla, M L. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.* 2006; 136(3): 588-594.
- Cho, E Y, Seddon, J M, Rosner, B, Willett, W C and Hankinson, S E. Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy. *Archives of Ophthalmology* 2004; 122(6): 883-892.
- De Ritter, E and Purcell, A (1981). Carotenoid analytical methods. Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors, Academic Press, London: 883-916.
- de Vries, J, Antoine, J-M, Burzykowski, T, Chiodini, A, Gibney, M, Kuhnle, G, Meheust, A, Pijls, L and Rowland, I. Markers for nutrition studies: review of criteria for the evaluation of markers. *European J. Nutr.* 2013; 52(7): 1685-1699.
- Di Mascio, P, Devasagayam, T P, Kaiser, S and Sies, H. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem. Soc. Trans.* 1990; 18(6): 1054-1056.

- Du, M, Wu, M, Fu, D, Yang, S, Chen, J, Wilson, K and Lyons, T J. Effects of modified LDL and HDL on retinal pigment epithelial cells: a role in diabetic retinopathy? *Diabetologia* 2013; 56(10): 2318-2328.
- Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to lutein in combination with zeaxanthin, and maintenance of normal vision (ID 1606) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011; 9(4): 2039 [2014pp.]-2039 [2014pp.].
- Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lutein and maintenance of normal vision (ID 1603, 1604, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2012; 10(6): 2716 [2717pp.]-2716 [2717pp.].
- Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to a combination of lutein and zeaxanthin and improved vision under bright light conditions pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2014; 12(7): 3753 [3712pp.]-3753 [3712pp.].
- Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin A. *EFSA Journal* 2015; 13(3): 4028 [4084pp.]-4028 [4084pp.].
- Ekesa, B, Poulaert, M, Davey, M W, Kimiywe, J, Van den Bergh, I, Blomme, G and Dhuique-Mayer, C. Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in bananas (*Musa* spp.) and derived dishes in African countries. *Food Chem.* 2012; 133(4): 1471-1477.
- Engles, M, Wooten, B and Hammond, B. Macular pigment: A test of the acuity hypothesis. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2007; 48(6): 2922-2931.
- Estévez-Santiago, R, Beltrán-de-Miguel, B, Cuadrado-Vives, C and Olmedilla-Alonso, B. Software application for the calculation of dietary intake of individual carotenoids and of its contribution to vitamin A intake. *Nutr. Hosp.* 2013; 28((3)): 823-829.
- Estévez-Santiago, R, Olmedilla-Alonso, B, Beltrán-de-Miguel, B and Cuadrado-Vives, C. The importance of the food source and its color in the relationship between lutein and zeaxanthin intake from fruit, vegetable and eggs and their associations with

- nutritional status and the macular pigment optical density in Spanish subjects. *Brit. J. Nutr.* Enviado 21 julio 2015 2015a.
- Estévez-Santiago, R, Olmedilla-Alonso, B and Fernández-Jalao, I. Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in major β -cryptoxanthin food contributors to its intake in the Spanish population. *Food. Func.* Enviado el 13 de Octubre 2015 2015b.
- Estévez-Santiago, R, Olmedilla Alonso, B and Beltrán de Miguel, B. Relationship between macular pigment optical density and contrast sensitivity in two age groups and the influence of dietary and biochemical markers of lutein and zeaxanthin. *Nutr. Res.* Enviado el de 8 de Octubre de 2015 2015c.
- Estévez-Santiago, R, Trancoso-Reyes, N, Ochoa-Martínez, L A, Fernández-Jalao, I and Olmedilla-Alonso, B. Efecto del tratamiento con vapor y microondas durante tiempos variables sobre el contenido y bioaccesibilidad del b-caroteno. *Libro de comunicaciones del XVII Congreso Latinoamericano de Nutrición*, 2015d.
- Faber, M, Wenhold, F A M, MacIntyre, U E, Wentzel-Viljoen, E, Steyn, N P and Oldewage-Theron, W H. Presentation and interpretation of food intake data: Factors affecting comparability across studies. *Nutrition* 2013; 29(11-12): 1286-1292.
- Failla, M L, Chitchumronchokchai, C, Ferruzzi, M G, Goltz, S R and Campbell, W W. Unsaturated fatty acids promote bioaccessibility and basolateral secretion of carotenoids and alpha-tocopherol by Caco-2 cells. *Food Funct.* 2014; 5(6): 1101-1112.
- Failla, M L, Huo, T and Thakkar, S K. In vitro screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2008; 17: 200-203.
- Failla, M L, Thakkar, S K and Kim, J Y. In Vitro Bioaccessibility of beta-Carotene in Orange Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(22): 10922-10927.
- FAO/LATINFOODS. (2009). Tabla de Composición de Alimentos de América Latina. Retrieved Diciembre 2012, from <http://www.rlc.fao.org/es/conozca-fao/que-hace-fao/estadisticas/composicion-alimento>.
- Fernandez-Garcia, E, Carvajal-Lerida, I, Jaren-Galan, M, Garrido-Fernandez, J, Perez-Galvez, A and Hornero-Mendez, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Res. Int.* 2012; 46(2): 438-450.

- FESNAD (2010). Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española. Pamplona, EUNSA.
- Fiedor, J and Burda, K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* 2014; 6(2): 466-488.
- George, S M, Thompson, F E, Midthune, D, Subar, A F, Berrigan, D, Schatzkin, A and Potischman, N. Strength of the relationships between three self-reported dietary intake instruments and serum carotenoids: the Observing energy and protein Nutrition (OPEN) Study. *Publ. Health Nutr.* 2012; 15(6): 1000-1007.
- Gil, A (2010). Tratado de Nutrición, Panamericana.
- Granado-Lorencio, F, Olmedilla-Alonso, B, Blanco-Navarro, I, Botella-Romero, F and Simal-Anton, A. Assessment of carotenoid status and the relation to glycaemic control in type I diabetics: a follow-up study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2006; 60(8): 1000-1008.
- Granado-Lorencio, F, Olmedilla-Alonso, B, Herrero-Barbudo, C, Blanco-Navarro, I, Perez-Sacristan, B and Blazquez-Garcia, S. In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chem.* 2007a; 102(3): 641-648.
- Granado-Lorencio, F, Olmedilla-Alonso, B, Herrero-Barbudo, C, Perez-Sacristan, B, Blanco-Navarro, I and Blazquez-Garcia, S. Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *J. Agric. Food Chem.* 2007b; 55(15): 6387-6394.
- Granado, F, Blazquez, S and Olmedilla, B. Changes in carotenoid intake from fruit and vegetables in the Spanish population over the period 1964-2004. *Publ. Health Nutr.* 2007a; 10(10): 1018-1023.
- Granado, F, Blázquez, S and Olmedilla, B. Changes in carotenoid intake from fruit and vegetables in Spanish population over the period 1964 - 2004. *Public Health Nutr* 2007b; 10(10): 1018-1023.
- Granado, F, Olmedilla, B and Blanco, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Brit. J. Nutr.* 2003; 90(3): 487-502.
- Granado, F, Olmedilla, B, Blanco, I, Gil Martínez, E and Rojas Hidalgo, E. Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: A user's point of view. *Crit Rev Food Sci* 1997a; 37(7): 621-633.

- Granado, F, Olmedilla, B, Blanco, I, GilMartinez, E and RojasHidalgo, E. Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: A user's point of view. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1997b; 37(7): 621-633.
- Granado, F, Olmedilla, B, Blanco, I and Rojas Hidalgo, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J. Agr. Food. Chem.* 1992; 40: 2135-2140.
- Granado, F, Olmedilla, B, Blanco, I and Rojas Hidalgo, E. Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1996; 50(4): 246-250.
- Granado, F, Olmedilla, B, Gil-Martinez, E and Blanco, I. A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 2001; 14(5): 479-489.
- Granado, F, Olmedilla, B, Gil-Martinez, E, Blanco, I, Millan, I and Rojas-Hidalgo, E. Carotenoids, retinol and tocopherols in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and their immediate relatives. *Clin. Sci.* 1998; 94(2): 189-195.
- Granado, F, Olmedilla, B, Herrero, C, Perez-Sacristan, B, Blanco, I and Blazquez, S. Bioavailability of Carotenoids and Tocopherols from broccoli: In vivo and in vitro assessment. *Experimental Biology and Medicine* 2006; 231(11): 1733-1738.
- Hammond, B R, CurranCelentano, J, Judd, S, Fuld, K, Krinsky, N I, Wooten, B R and Snodderly, D M. Sex differences in macular pigment optical density: Relation to plasma carotenoid concentrations and dietary patterns. *Vision Res.* 1996; 36(13): 2001-2012.
- Hammond, B R, Fletcher, L M, Roos, F, Wittwer, J and Schalch, W. y A Double-Blind, Placebo-Controlled Study on the Effects of Lutein and Zeaxanthin on Photostress Recovery, Glare Disability, and Chromatic Contrast. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2014; 55(12): 8583-8589.
- Hammond, B R, Jr., Fletcher, L M and Elliott, J G. Glare Disability, Photostress Recovery, and Chromatic Contrast: Relation to Macular Pigment and Serum Lutein and Zeaxanthin. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2013; 54(1): 476-481.
- Hammond, B R, Wooten, B R and Snodderly, D M. Preservation of visual sensitivity of older subjects: Association with macular pigment density. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 1998; 39(2): 397-406.

- Handelman, G J, Dratz, E A, Reay, C C and Vankuijk, F. Carotenoids in the human macula and whole retina. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 1988; 29(6): 850-855.
- Hannoufa, A H, Z T. A. L. Library. (2011). Carotenoid Biosynthesis and Regulation in Plants. 2015, from <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=40302>.
- Harper, A (1999). Defining the essentiality of nutrients. Modern Nutrition in Health and disease. M. Shils, J. Olson, M. Shike and A. Ross. Baltimore, Williams and Wilkins: 3-10.
- Heber, D and Bowerman, S. Applying science to changing dietary patterns. *J. Nutr.* 2001; 131(11): 3078S-3081S.
- Hedren, E, Diaz, V and Svanberg, U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002; 56(5): 425-430.
- Holden, J, Bhagwat, S, Beecher, G, Davis, C, Buzzard, I M, Eldridge, A, Schakel, S, Trainer, D, Gebhardt, S and Haytowitz, D. USDA/NCC database for carotenoids in US foods. *FASEB J.* 1998; 12(4): A543-A543.
- Holden, J M, Eldridge, A L, Beecher, G R, Buzzard, I M, Bhagwat, S, Davis, C S, Douglass, L W, Gebhardt, S, Haytowitz, D and Schakel, S. Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. *J. Food Comp. Anal.* 1999; 12: 169-196.
- Hornero-Mendez, D and Minguez-Mosquera, M I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 2007; 8(3): 407-412.
- Huo, T, Ferruzzi, M G, Schwartz, S J and Failla, M L. Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(22): 8950-8957.
- INFOGEST, C a (2014). In vitro food digestion.
- Institute of Medicine IOM, Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids 2000
- Institute of Medicine IOM, Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. 2001

- Jansen, M, Van Kappel, A L, Ocke, M C, Van't Veer, P, Boshuizen, H C, Riboli, E and Bueno-de-Mesquita, H B. Plasma carotenoid levels in Dutch men and women, and the relation with vegetable and fruit consumption. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004; 58(10): 1386-1395.
- Jeffery, J L, Turner, N D and King, S R. Carotenoid bioaccessibility from nine raw carotenoid-storing fruits and vegetables using an in vitro model. *J. Sci. Food Agric.* 2012; 92(13): 2603-2610.
- Johnson, E J, Maras, J E, Rasmussen, H M and Tucker, K L. Intake of Lutein and Zeaxanthin Differ with Age, Sex, and Ethnicity. *J. Am. Diet. Assoc.* 2010; 110(9): 1357-1362.
- Kean, E G, Bordenave, N, Ejeta, G, Hamaker, B R and Ferruzzi, M G. Carotenoid bioaccessibility from whole grain and decorticated yellow endosperm sorghum porridge. *J. Cereal Sci.* 2011; 54(3): 450-459.
- Khachik, F, Spangler, C J, Smith, J C, Canfield, L M, Steck, A and Pfander, H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal. Chem.* 1997; 69(10): 1873-1881.
- Kopsell, D and Kopsell, D (2009). Carotenoids in vegetables: biosynthesis, occurrence, impacts on human health, and potential for manipulation. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables. R. Watson and V. Preedy, Academic Press.
- Kotake-Nara, E and Nagao, A. Absorption and Metabolism of Xanthophylls. *Mar. Drugs* 2011; 9(6): 1024-1037.
- Krinsky, N I and Johnson, E J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* 2005; 26(6): 459-516.
- Lien, E L and Hammond, B R. Nutritional influences on visual development and function. *Prog retin eye res* 2011a; 30: 188-203.
- Lien, E L and Hammond, B R. Nutritional influences on visual development and function. *Prog. Retinal Eye Res.* 2011b; 30(3): 188-203.
- Lipkie, T E, De Moura, F F, Zhao, Z-Y, Albertsen, M C, Che, P, Glassman, K and Ferruzzi, M G. Bioaccessibility of Carotenoids from Transgenic Provitamin A Biofortified Sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61(24): 5764-5771.
- Loskutova, E, Nolan, J, Howard, A and Beatty, S. Macular Pigment and Its Contribution to Vision. *Nutrients* 2013; 5(6): 1962-1969.

- Loughman, J, Akkali, M C, Beatty, S, Scanlon, G, Davison, P A, O'Dwyer, V, Cantwell, T, Major, P, Stack, J and Nolan, J M. The relationship between macular pigment and visual performance. *Vision Res.* 2010; 50(13): 1249-1256.
- Maiani, G, Periago Caston, M J, Catasta, G, Toti, E, Goni Cambrodon, I, Bysted, A, Granado-Lorenzo, F, Olmedilla-Alonso, B, Knuthsen, P, Valoti, M, Boehm, V, Mayer-Miebach, E, Behnsilian, D and Schlemmer, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53: S194-S218.
- Mares , J, LaRowe, T L, Snodderly, D M, Moeller, S M, Gruber, M J, Klein, M L, Wooten , B R, Johnson, E J and Chapell, R J. Predictors of optical density of lutein and zeaxanthin in retinas of older women in the Carotenoids in Age-related Eye Disease Study, an ancillary study of the Women's Health Initiative. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84: 1107-1122.
- Martínez Burgos, M A, Martínez- Victoria, I, Milá, R, Farrán, A, Farré, R, Ros, G, Yago, M D, Audi, N, Santana, C, López Millán, M B, Ramos López, S, Mañas, M and Martínez-Victoria, E. Building a unified Spanish food database according to EuroFIR specifications. *Food Chem* 2009; 113: 784-788.
- Martini, M C, Campbell, D R, Gross, M D, Grandits, G A, Potter, J D and Slavin, J L. PLASMA CAROTENOIDS AS BIOMARKERS OF VEGETABLE INTAKE - THE UNIVERSITY-OF-MINNESOTA CANCER PREVENTION RESEARCH UNIT FEEDING STUDIES. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 1995; 4(5): 491-496.
- Mataix, J, Mañas, M, Llopis, J and Martínez de Victoria, E (2003). Tablas de composición de Alimentos Españoles. . Granada, Universidad de Granada.
- Meagher, K A, Thurnham, D I, Beatty, S, Howard, A N, Connolly, E, Cummins, W and Nolan, J M. Serum response to supplemental macular carotenoids in subjects with and without age-related macular degeneration. *Brit. J. Nutr.* 2013; 110(2): 289-300.
- Menchú, M (2012). Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Guatemala, Guatemala: INCAP/OPS.

- Minekus, M, Alming, M, Alvito, P, Ballance, S, Bohn, T, Bourlieu, C, Carriere, F, Boutrou, R, Corredig, M, Dupont, D, Dufour, C, Egger, L, Golding, M, Karakaya, S, Kirkhus, B, Le Feunteun, S, Lesmes, U, Macierzanka, A, Mackie, A, Marze, S, McClements, D J, Menard, O, Recio, I, Santos, C N, Singh, R P, Vegarud, G E, Wickham, M S J, Weitschies, W and Brodkorb, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct.* 2014a; 5(6): 1113-1124.
- Minekus, M, Alming, M, Alvito, P, Ballance, S, Bohn, T, Bourlieu, C, Carriere, F, Boutrou, R, Corredig, M, Dupont, D, Dufour, C, Egger, L, Golding, M, Karakaya, S, Kirkhus, B, Le Feunteun, S, Lesmes, U, Macierzanka, A, Mackie, A, Marze, S, McClements, D J, Menard, O, Recio, I, Santos, C N, Singh, R P, Vegarud, G E, Wickham, M S J, Weitschies, W and Brodkorb, A. (2014b, Jun). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. Supplementary Material: Protocol for enzyme assays. *Food Funct.*, from <http://www.rsc.org/suppdata/fo/c3/c3fo60702j/c3fo60702j1.pdf>.
- Mirmiran, P, Bahadoran, Z, Moslehi, N, Bastan, S and Azizi, F. Colors of fruits and vegetables and 3-year changes of cardiometabolic risk factors in adults: Tehran lipid and glucose study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2015.
- Moeller, S M, Volland, R, Sarto, G E, Gobel, V L, Streicher, S L and Mares, J A. Women's Health Initiative Diet Intervention Did Not Increase Macular Pigment Optical Density in an Ancillary Study of a Subsample of the Women's Health Initiative. *J. Nutr.* 2009; 139(9): 1692-1699.
- Moreiras, O, Carbajal, A, Cabrera, L and Cuadrado, C (2011). *Tablas de Composición de Alimentos*. Madrid, Ediciones Pirámide.
- Moreiras, O, Carbajal, A, Cabrera, L and Cuadrado, C (2013). *Tablas de Composición de Alimentos*. Madrid, Ediciones Pirámide.
- Mulokozi, G, Lietz, G, Svanberg, U, Mugyabuso, J K, Henry, J C K and Tomkins, A M. Plasma levels of retinol, carotenoids, and tocopherols in relation to dietary pattern among pregnant Tanzanian women. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2003; 73(5): 323-333.
- Murray, I J (2014). *Macular Pigment: Characteristics and Role in the Older Eye. The new visual neurosciences*. J. Werner and L. Chalupa. London, MIT Press Cambridge.

- Murray, I J and Carden, D. (2013). Measuring macular pigment. Retrieved 01/10/2015, from http://elektron-healthcare.com/sites/elektron-healthcare.com/files/mpsll_rebuttal_optician_8_3_13.pdf.
- Nagao, A. Absorption and metabolism of dietary carotenoids. *Biofactors* 2011; 37(2): 83-87.
- Nolan, J M, Stack, J, O'Connell, E and Beatty, S. The relationships between macular pigment optical density and its constituent carotenoids in diet and serum. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2007; 48(2): 571-582.
- NRC (1980). Recommended dietary allowances, National Academies.
- NRC (1989). Recommended dietary allowances, National Academies.
- O'Connell, E, Neelam, K, Nolan, J, Eong, K-G A and Beatty, S. Macular carotenoids and age-related maculopathy. *Annals Academy of Medicine Singapore* 2006; 35(11): 821-830.
- O'Connell, O F, Ryan, L and O'Brien, N M. Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutr. Res.* 2007; 27(5): 258-264.
- O'Neill, M E, Carroll, Y, Corridan, B, Olmedilla, B, Granado, F, Blanco, I, Van den Berg, H, Hininger, I, Rousell, A M, Chopra, M, Southon, S and Thurnham, D I. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Brit. J. Nutr.* 2001; 85(4): 499-507.
- O'Sullivan, L, Galvin, K, Aherne, S A and O'Brien, N M. Effects of cooking on the profile and micellarization of 9-cis-, 13-cis- and all-trans-beta-carotene in green vegetables. *Food Res. Int.* 2010; 43(4): 1130-1135.
- Olmedilla-Alonso, B, Beltran-de-Miguel, B, Estevez-Santiago, R and Cuadrado-Vives, C. Markers of lutein and zeaxanthin status in two age groups of men and women: dietary intake, serum concentrations, lipid profile and macular pigment optical density. *Nutr. J.* 2014; 13.
- Olmedilla-Alonso, B and Estévez-Santiago, R (2015). Estimación de la ingesta de carotenoides en la dieta. Carotenoides en agroalimentación y salud. . C.-I. e. prensa. México, Terracota.

- Olmedilla-Alonso, B, Granado-Lorencio, F, Castro-Feito, J, Herrero-Barbudo, C, Blanco-Navarro, I and Pérez-Sacristán, B. Bioavailability of lutein (free and ester forms) in humans: assessment using exposition and functional biomarkers. . *Acta Biochim Pol* 2008; 55: 4-5.
- Olmedilla Alonso, B (2007). Luteína y micronutrientes en la prevención de la degeneración macular asociada a la edad. Nutrición y alimentación en promoción de la salud. R. Ortega Anta , A. Requejo Marcos and R. Martinez García, Consejería de Sanidad de Castilla-La Mancha.
- Olmedilla, B, Granado, F, Blanco, I and Gil-Martínez, E. Carotenoid content in fruit and vegetables and its relevance to human health: Some of the factors involved. *Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.* 1998; 2(1): 57-70.
- Olmedilla, B, Granado, F, Blanco, I and Rojas-Hidaigo, E. Determination of nine carotenoids, retinol, retinyl palmitate and c -tocopherol in control human serum using two internal standards. *Food Chem.* 1992; 45: 205--213.
- Olmedilla, B, Granado, F, Blanco, I and Vaquero, M. Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: A 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition* 2003; 19(1): 21-24.
- Olmedilla, B, Granado, F, GilMartinez, E, Blanco, I and RojasHidalgo, E. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin dependent diabetic Spanish subjects. *Clinical Chemistry* 1997; 43(6): 1066-1071.
- Olmedilla, B, Granado, F and Rojas-Hidalgo, E (1993). Quantitation of provitamin and non provitamin A carotenoids in fruits most frequently consumed in Spain. . *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*: 141-145.
- Olmedilla, B, Granado, F, Southon, S, Wright, A J A, Blanco, I, Gil-Martinez, E, van den Berg, H, Corridan, B, Roussel, A M, Chopra, M and Thurnham, D I. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *Brit. J. Nutr.* 2001; 85(2): 227-238.
- Olson, J A and Krinsky, N I. The colorful, fascinating world of the carotenoids: Important physiologic modulators - Introduction. *FASEB J.* 1995; 9(15): 1547-1550.
- Organización Mundial de la Salud OMS, Dieta Nutrición y prevención de enfermedades crónicas 1990

- Oomen, A G, Hack, A, Minekus, M, Zeijdner, E, Cornelis, C, Schoeters, G, Verstraete, W, Van de Wiele, T, Wragg, J, Rompelberg, C J M, Sips, A and Van Wijnen, J H. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36(15): 3326-3334.
- Oomen, A G, Rompelberg, C J M, Bruil, M A, Dobbe, C J G, Pereboom, D and Sips, A. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2003; 44(3): 281-287.
- Ornelas-Paz, J D J, Failla, M L, Yahia, E M and Gardea-Bejar, A. Impact of the stage of ripening and dietary fat on in vitro bioaccessibility of beta-carotene in 'Ataulfo' mango. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(4): 1511-1516.
- Ortega , R, Aranceta , J, Ll, S-M, Entrala, A, Gil, A and Mena, M. Nutritional Risks in the Spanish population: results of the eVe study. . *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003; 57(1): S73-75.
- Oude Griep, L M, Verschuren, W M M, Kromhout, D, Ocke, M C and Geleijnse, J M. Colors of Fruit and Vegetables and 10-Year Incidence of Stroke. *Stroke* 2011; 42(11): 3190-3195.
- Pacheco, S. Cromatografía líquida. Retrieved 02/09/2015, 2015, from <http://www.cromatografialiquida.com.br/carotenoidesindex.htm>.
- Patterson, R and Pietinen, P (2006). Evaluación del estado nutricional en individuos y poblaciones. Nutrición y salud pública. M. B. Gibney ML, Kearney JM, Arab L. . Zaragoza Acribia SA
- Pee, S d, West, C E, Permaesih, D, Martuti, Muhilal and Hautvast, J G A J. Orange fruit is more effective than are dark-green, leafy vegetables in increasing serum concentrations of retinol and beta-carotene in schoolchildren in Indonesia. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 68(5): 1058-1067.
- Pennington, J A T and Fisher, R A. Food component profiles for fruit and vegetable subgroups. *J. Food Compos. Anal.* 2010; 23(5): 411-418.
- Perera, C O and Yen, G M. Functional properties of carotenoids in human health. *Int. J. Food Prop.* 2007; 10(2): 201-230.
- Perusek, L and Maeda, T. Vitamin A Derivatives as Treatment Options for Retinal Degenerative Diseases. *Nutrients* 2013; 5(7): 2646-2666.

- Puell, M C, Palomo-Alvarez, C, Barrio, A R, Gomez-Sanz, F J and Jesus Perez-Carrasco, M. Relationship between macular pigment and visual acuity in eyes with early age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2013; 91(4): E298-E303.
- Pugliese, A, O'Callaghan, Y, Tundis, R, Galvin, K, Menichini, F, O'Brien, N and Loizzo, M R. In vitro Assessment of the Bioaccessibility of Carotenoids from Sun-Dried Chili Peppers. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2014; 69(1): 8-17.
- Rasmussen, H M, Muzhingi, T, Eggert, E M R and Johnson, E J. Lutein, zeaxanthin, meso-zeaxanthin content in egg yolk and their absence in fish and seafood. *J. Food Compos. Anal.* 2012; 27(2): 139-144.
- Reboul, E, Abou, L, Mikail, C, Ghiringhelli, O, Andre, M, Portugal, H, Jourdeuil-Rahmani, D, Amiot, M J, Lairon, D and Borel, P. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem. J.* 2005; 387: 455-461.
- Reboul, E, Richelle, M, Perrot, E, Desmoulins-Malezet, C, Pirisi, V and Borel, P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54(23): 8749-8755.
- Reif, C, Arrigoni, E, Baumgartner, D, Schaerer, H, Nising, A B and Hurrell, R F (2014). Adaption of an In Vitro Digestion Method to Evaluate Carotenoid Accessibility from Vegetables. Iii International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables - Favhealth 2009. B. Patil, O. VanKooten and M. J. AmiotCarlin. 1040.
- Renzi, L M, Hammond, B R, Jr., Dengler, M and Roberts, R. The relation between serum lipids and lutein and zeaxanthin in the serum and retina: results from cross-sectional, case-control and case study designs. *Lipids Health Dis.* 2012; 11.
- Requejo, A, Ortega, R, Andrés, P, Ruiz, F, Sánchez-Muniz, F and González-Fernández, M (2004). Tablas de composición de alimentos españoles. Edición coordinada por Carretero ML y Gómez MD. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Richer, S, Stiles, W, Statkute, L, Pulido, J, Frankowski, J, Rudy, D, Pei, K, Tshipursky, M and Nyland, J. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular

- degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry (St. Louis, Mo.)* 2004; 75(4): 216-230.
- Rodrigo, M J, Cilla, A, Barbera, R and Zacarias, L. Carotenoid bioaccessibility in pulp and fresh juice from carotenoid-rich sweet oranges and mandarins. *Food Funct.* 2015; 6(6): 1950-1959.
- Rodriguez-Amaya, D B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *J. Food Compos. Anal.* 2010; 23(7): 726-740.
- Rodriguez-Carmona, M, Kivansakul, J, Harlow, J A, Kopcke, W, Schalch, W and Barbur, J L. The effects of supplementation with lutein and/or zeaxanthin on human macular pigment density and colour vision. *Ophthalmic and Physiological Optics* 2006; 26(2): 137-147.
- Rodriguez-Roque, M J, Rojas-Grau, M A, Elez-Martinez, P and Martin-Belloso, O. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61(8): 1859-1867.
- Rodriguez Amaya, D (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. Washington, D. C.
- Rosso, V V d and Mercadante, A Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(13): 5062-5072.
- Saari, J C (2012). Vitamin A Metabolism in Rod and Cone Visual Cycles. *Annu. Rev. Nutr.* R. J. Cousins. 32: 125-146.
- Santillan, J E, Issolio, L A and Colombo, E M. A statistical criterion to establish normal ranges for age in a contrast sensitivity function test. *Opt. Appl.* 2014; 44(2): 213-225.
- Sauberlich, H, Hodges, R, Wallace, D, Kolder, H, Canham, J, Hood, J, Raica Jr, N and Lowry, L. Vitamin A metabolism and requirements in the human studied with the use of labeled retinol. *Vitam Horm* 1974; 32(25): 1-75.
- Scott, K J. Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry. *Current protocols in food analytical chemistry* 2001.

- Schweiggert, R M, Mezger, D, Schimpf, F, Steingass, C B and Carle, R. Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato. *Food Chem.* 2012; 135(4): 2736-2742.
- Seddon, J M, Ajani, U A, Sperduto, R D, Hiller, R, Blair, N, Burton, T C, Farber, M D, Gragoudas, E S, Haller, J, Miller, D T, Yannuzzi, L A and Willett, W. DIETARY CAROTENOIDS, VITAMIN-A, VITAMIN-C, AND VITAMIN-E, AND ADVANCED AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1994; 272(18): 1413-1420.
- Semba, R D and Dagnelie, G. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? *Med. Hypotheses* 2003; 61(4): 465-472.
- Shao, A and Hathcock, J N. Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2006; 45(3): 289-298.
- Shardell, M, Alley, D, Hick, G and El-Kamary, S. Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr. Res.* 2011; 31: 178-189.
- Shcereumder, D A (2014). Vision and visual perception,, Archway publishing.
- Sigma Aldrich. Assay Procedure for Cholesterol Esterase. 2015, from <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/assay-procedure-for-cholesterol-esterase.html>.
- Stahl, W and Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* 2003; 24(6): 345-351.
- Stringham, J M, Bovier, E R, Wong, J C and Hammond, B R, Jr. The Influence of Dietary Lutein and Zeaxanthin on Visual Performance. *J. Food Sci.* 2010; 75(1): R24-R29.
- Stringham, J M and Hammond, B R. Macular pigment and visual performance under glare conditions. *Optometry and Vision Science* 2008; 85(2): 82-88.
- Stringham, J M and Hammond, B R, Jr. The glare hypothesis of macular pigment function. *Optometry and Vision Science* 2007; 84(9): 859-864.
- Svelander, C A, Lopez-Sanchez, P, Pudney, P D A, Schumm, S and Alminger, M A G. High Pressure Homogenization Increases the In Vitro Bioaccessibility of alpha- and beta-Carotene in Carrot Emulsions But Not of Lycopene in Tomato Emulsions. *J. Food Sci.* 2011; 76(9): H215-H225.

- Tang, G. Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. *Am J Clin Nutr* 2010; ;1(suppl): 1468S–1473S.
- Thakkar, S K and Failla, M L. Bioaccessibility of Pro-Vitamin A Carotenoids Is Minimally Affected by Non Pro-Vitamin A Xanthophylls in Maize (*Zea mays* sp.). *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(23): 11441-11446.
- Thakkar, S K, Huo, T, Maziya-Dixon, B and Failla, M L. Impact of Style of Processing on Retention and Bioaccessibility of beta-Carotene in Cassava (*Manihot esculanta*, Crantz). *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(4): 1344-1348.
- Thakkar, S K, Maziya-Dixon, B, Dixon, A G O and Failla, M L. beta-Carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to beta-Carotene content in different genotypes of cassava. *J. Nutr.* 2007; 137(10): 2229-2233.
- Thurnham, D I. Bioequivalence of beta-carotene and retinol. *J. Sci. Food Agric.* 2007a; 87(1): 13-39.
- Thurnham, D I. Macular zeaxanthins and lutein - a review of dietary sources and bioavailability and some relationships with macular pigment optical density and age-related macular disease. *Nutr. Res. Rev.* 2007b; 20(2): 163-179.
- Thurnham, D I, Northrop-Clewes, C A and Chopra, M. Biomarkers of vegetable and fruit intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 68(3): 756-757.
- Thyagarajan, B, Meyer, K A, Smith, L J, Beckett, W S, Williams, O D, Gross, M D and Jacobs, D R, Jr. Serum carotenoid concentrations predict lung function evolution in young adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 94(5): 1211-1218.
- USDA-ARSU.S. Department of Agriculture Agricultural Research Service. (2012). What We Eat in America, NHANES 2009-2010. from http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400530/pdf/0910/tables_1-40_2009-2010.pdf.
- USDAU. S. D. o. A. A. R. Service. (2011). choosemyplate.gov-vegetable-food gallery-Commonly eaten vegetables in each subgroup. Retrieved 07/07/2015, 2015, from <http://www.choosemyplate.gov/food-groups/vegetables-foodgallery.html>.

- Vadiveloo, M, Dixon, L B, Mijanovich, T, Elbel, B and Parekh, N. Development and evaluation of the US Healthy Food Diversity index. *British Journal of Nutrition* 2014; 112(9): 1562-1574.
- Vadiveloo, M, Parekh, N and Mattei, J. Greater healthful food variety as measured by the US Healthy Food Diversity Index is associated with lower odds of metabolic syndrome and its components in US adults (vol 145, pg 564, 2015). *Journal of Nutrition* 2015; 145(6): 1373-1373.
- van der Veen, R L P, Berendschot, T T J M, Hendrikse, F, Carden, D, Makridaki, M and Murray, I J. A new desktop instrument for measuring macular pigment optical density based on a novel technique for setting flicker thresholds. *Ophthalmic and Physiological Optics* 2009; 29(2): 127-137.
- Varela-Moreiras G, y o. Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the food Consumption Survey: updated information. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2010: S37-S43.
- von Lintig, J (2010). Colors with Functions: Elucidating the Biochemical and Molecular Basis of Carotenoid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr. R. J. Cousins.* 30: 35-56.
- World Cancer Research Fund International WCRF, Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. 2007
- Wenzel, A J, Sheehan, J P, Burke, J D, Lefsrud, M G and Curran-Celentano, J. Dietary intake and serum concentrations of lutein and zeaxanthin, but not macular pigment optical density, are related in spouses. *Nutr. Res.* 2007; 27(8): 462-469.
- West, C and Poortvliet, E (1993). The carotenoid content of foods with special reference to developing countries, VITAL, International Science and Technology Institute, Arlington, Virginia.
- World Health Organization Global Database on Vitamin A Deficiency WHO, Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005 2009
- WHO/FAOWorld Health Organization/Food and Agricultural Organization of the United Nations. (2003). Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health: Promoting fruit and vegetable consumption around the world. Retrieved 08/07/2015, 2015, from <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>.

- WHO/FAO (2004). Vitamin and mineral requirements in human nutrition. World Health Organization, World Health Organization/Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Willett, W C, Stampfer, M J, Underwood, B A, Taylor, J O and Hennekens, C H. VITAMIN-A, VITAMIN-E, AND CAROTENE - EFFECTS OF SUPPLEMENTATION ON THEIR PLASMA-LEVELS. *Am. J. Clin. Nutr.* 1983; 38(4): 559-566.
- Zeimer, M, Hense, H W, Heimes, B, Austermann, U, Fobker, M and Pauleikhoff, D. The macular pigment: short- and intermediate-term changes of macular pigment optical density following supplementation with lutein and zeaxanthin and co-antioxidants. *Ophthalmologie* 2009; 106(1): 29-36.
- Zheng, X, Zhu, F, Wu, M, Yan, X, Meng, X and Song, Y. A rapid and effective approach for on-site assessment of total carotenoid content in wolfberry juice during processing. *J. Sci. Food Agric.* 2015; 95(14): 2951-2955.

ANEXOS

Anexo 1: Autorización del Comité Ético de Investigación

Clínica

**D^a LOURDES CABRERA GARCÍA, SECRETARIA DEL COMITÉ ETICO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA
DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID**

CERTIFICA

Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado:

**“BIOMARCADORES DE LUTEÍNA Y ZEAXANTINA EN LA RELACIÓN
DIETA Y SALUD OCULAR HUMANA: EVALUACIÓN DE
CONCENTRACIONES EN SUERO Y DIETA, DENSIDAD DE PIGMENTO
MACULAR Y FUNCIÓN VISUAL”**

del que es Investigadora Principal la Dra. Begoña Olmedilla Alonso, considerando que
su planteamiento es correcto desde el punto de vista metodológico y ético. Acta nº
257 de fecha 19/07/10

En Majadahonda, a 19 de julio de 2010



Hospital Universitario
Puerta de Hierro
Majadahonda



Comunidad de Madrid

Comité Ético de Investigación
Clínica



Fdo.: Dra. Cabrera García
Secretaria C.E.I.C.

Anexo 2: Documento de información voluntarios del estudio del proyecto AES PS09/00681

HOJA DE INFORMACIÓN

Título del estudio: Biomarcadores de luteína y zeaxantina en la relación dieta y salud ocular humana: evaluación de concentraciones en suero y dieta, densidad de pigmento macular y función visual.

Proyecto financiado por la Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III (PS09/00681).

Investigadores: Begoña Olmedilla Alonso M^a Carmen Cuadrado Vives
Beatriz Beltrán de Miguel

Centros: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN).CSIC. C/ José Antonio Novais, 10. 28040-Madrid.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid.

Introducción

A través de esta hoja de información deseamos que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello, léala con atención y le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

El **objetivo** de este estudio es valorar los biomarcadores de estatus nutricional de luteína y zeaxantina en personas con edad comprendida entre 20 y 35 años o entre 45 y 65 años, así como la función visual.

La luteína y la zeaxantina son componentes habituales de nuestra dieta, se encuentran sobre todo en hortalizas y frutas. Pertenecen a un grupo de compuestos conocidos con el nombre de carotenoides (algunos de los cuales, como el β -caroteno tienen actividad de vitamina A). La luteína y la zeaxantina están presente en nuestra sangre y tejidos, siendo la retina el lugar donde se depositan de forma preferente, formando el pigmento macular. Ambos actúan en la retina como filtros de luz y como antioxidantes, produciendo efectos beneficiosos en los ojos.

El equipo de investigación que lleva a cabo este estudio tiene una amplia experiencia en estudios con carotenoides, habiendo realizado estudios analíticos en alimentos y en suero humano, valoraciones de ingesta dietética, así como también estudios con aporte extra de luteína tanto en sujetos sanos como en pacientes.

Descripción general del estudio

En este estudio participarán 100 voluntarios (50 hombres, 50 mujeres) con edad comprendida en los rangos entre 20 y 35 años y 45 y 65 años, con un índice de masa corporal menor a 31 kg/m², que no tomen medicación (ni productos tipo Benecol, Danacol, etc) para disminuir el colesterol en sangre, que no tengan cataratas y que no consuman complementos vitamínicos, minerales o de luteína.

El estudio se llevará a cabo en el ICTAN, donde se realizarán las pruebas siguientes:

- 1) extracción de sangre (8-10 ml, en ayunas al menos 8 horas) para determinar la concentración de luteína y zeaxantina, así como parámetros bioquímicos generales (incluyendo colesterol y triglicéridos).
- 2) valoración de la densidad del pigmento macular.
- 3) valoración de la sensibilidad al contraste (con y sin deslumbramiento).
- 4) registro de dieta mediante un "recuerdo de 24-horas" (mediante entrevista el primer día y mediante llamada telefónica en otras dos ocasiones).

El tiempo estimado para la realización de todas las pruebas es, aproximadamente, de una hora y se realizarán en un mismo día. Posteriormente, en la semana siguiente, se harán dos llamadas telefónicas de 10-15 minutos / llamada para el registro de la dieta.

Las extracciones de sangre se realizarán en el edificio colindante al ICTAN, el CENIM (Avda Gregorio del Amo, 8) por un ATS autorizado por la Unidad de Vigilancia de la Salud del CSIC.

La determinación de la función visual se realizará por medio de la prueba de sensibilidad al contraste (valora la habilidad del sujeto para distinguir entre un objeto y el fondo), con y sin deslumbramiento. La otra prueba visual, la densidad del pigmento macular mide la cantidad de los pigmentos (luteína y zeaxantina) que contiene la mácula, en base a la respuesta del sujeto ante diferentes niveles de luz. En ambas pruebas el sujeto tiene que mirar y presionar un botón cada vez que visualice lo que se le indica (círculos en el test de sensibilidad al contraste y círculo al vibrar o parpadear, en la valoración del pigmento macular).

Beneficios esperables del estudio en el ámbito social y clínico

La luteína y la zeaxantina son componentes de la dieta y el organismo humano y su concentración en la mácula se ha relacionado de forma inversa con diversas enfermedades de la vista, entre otras. En este estudio se valorarán cuatro marcadores de estos compuestos, lo que permitirá conocer, de la forma más precisa posible actualmente, el estado nutricional de luteína, zeaxantina, así como de otros compuestos relevantes en la salud ocular (ej. DHA, EPA, zinc, valorados mediante la dieta) lo que posibilitará la toma de decisiones respecto a la suplementación de la dieta con estos compuestos, bien mediante complementos dietéticos (ya existentes en el mercado) o alimentos funcionales (actualmente en proceso de evaluación por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).

La decisión de utilizar aporte extra a la dieta debe estar basada en datos que indiquen su necesidad y también tener un objetivo que alcanzar mediante su utilización, y para ello se necesita la información que aportarán los biomarcadores objeto de este estudio.

En un nivel más general, los datos obtenidos en este estudio contribuirán a un mayor conocimiento de la biodisponibilidad de luteína y zeaxantina a partir de la dieta total (y su posible incorporación en Tablas de Composición de Alimentos), así como al establecimiento de requerimientos nutricionales y recomendaciones dietéticas.

Participación voluntaria

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento.

Confidencialidad

La identidad de los participantes estará preservada durante la manipulación de muestras y de datos, de acuerdo a la LOPD 15/1999 de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, así como el R.D. 1720/2007, que aprueba el reglamento de desarrollo de la LOPD. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador principal del estudio. El estudio se lleva a cabo siguiendo la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos (14/2007).

Compensación económica

Se contempla una pequeña compensación económica de 40 euros por el tiempo dedicado al estudio y posibles gastos derivados de su participación (ej. de transporte y desayuno).

Otra información relevante

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Mientras permanezca en este estudio no deberá participar en ningún otro ensayo clínico.

Gracias por su interés. Si desea participar en el estudio, puede contactar

con:

Dra. Begoña Olmedilla Alonso Dpto Metabolismo y Nutrición. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Tel: 91 5492300 ext. 392.

Fax: 91 549 3627 e-mail:

bolmedilla@ictan.csic.es

Dra. M^a Carmen Cuadrado Vives / Dra. Beatriz Beltrán de Miguel

Facultad de Farmacia.

Universidad Complutense. Madrid.

Tel: 913941809 Fax: 913941810 e-

mail: ccuadrad@farm.ucm.es / beabel@farm.ucm.es

**Anexo 3: Consentimiento informado de los voluntarios
del estudio del Proyecto AES PS09/00681.**

Consentimiento informado

Estudio: “Biomarcadores de luteína y zeaxantina en la relación dieta y salud ocular humana:

evaluación de concentraciones en suero y dieta, densidad de pigmento macular y función visual”.

Proyecto AES (PS09/00681).

Investigadores: Begoña Olmedilla Alonso
M^a Carmen Cuadrado Vives
Beatriz Beltrán de Miguel

Centros: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). CSIC.
C/ José Antonio Novais, 10. Madrid.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid.

Yo, (nombre y apellidos).....
con DNI nº,residente en
calle/plaza.....
he recibido la información necesaria por parte de la Dra
sobre el proyecto titulado “Biomarcadores de luteína y zeaxantina en la relación
dieta y salud ocular humana: evaluación de concentraciones en suero y dieta,
densidad de pigmento macular y función visual” que se llevará a cabo en el ICTAN
del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Considero que la información recibida ha sido relevante, clara y suficiente, la
he entendido y he formulado todas las preguntas y dudas que me ha podido suscitar,
habiendo sido respondidas satisfactoriamente en su totalidad.

Entiendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar
explicaciones. Por tanto, presto libremente mi conformidad para participar en el
estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las
condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que las muestras de sangre obtenidas para el estudio puedan
ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con el objetivo del
estudio actual: Sí / No (poner un círculo en lo que interese).

Madrid, de de 2011

Fdo:
Nombre y firma del investigador

Fdo:
Nombre y firma del voluntario

**Anexo 4: Encuesta dietética utilizada para el estudio del
Proyecto AES PS09/00681.**

NOMBRE:
FECHA DEL DÍA DEL RECUERDO:

DESAYUNO	
<p>Tipo de café (soluble o de cafetera):</p> <p>Tipo de pan:</p>	
<p>Azúcar:</p> <p>Tipo de leche:</p>	
MEDIA MAÑANA	
<p>COMIDA</p> <p>Primer plato:</p> <p>Segundo plato:</p> <p>Postre:</p> <p>Pan:</p> <p>Bebida:</p>	
<p>Café:</p> <p>Aceite:</p>	
MERIENDA	
CENA	
<p>Postre:</p> <p>Pan:</p> <p>Bebida:</p>	
<p>Aceite:</p>	
ENTRE HORAS	

NOMBRE:
FECHA DEL DÍA DEL RECUERDO:

DESAYUNO	
<p>Tipo de café (soluble o de cafetera):</p> <p>Tipo de pan:</p>	
<p>Azúcar:</p> <p>Tipo de leche:</p>	
MEDIA MAÑANA	
<p>COMIDA</p> <p>Primer plato:</p> <p>Segundo plato:</p> <p>Postre:</p> <p>Pan:</p> <p>Bebida:</p>	
<p>Café:</p> <p>Aceite:</p>	
MERIENDA	
CENA	
<p>Postre:</p> <p>Pan:</p> <p>Bebida:</p>	
<p>Aceite:</p>	
ENTRE HORAS	

NOMBRE:
FECHA DEL DÍA DEL RECUERDO:

DESAYUNO	
<p>Tipo de café (soluble o de cafetera):</p> <p>Tipo de pan:</p>	
<p>Azúcar:</p> <p>Tipo de leche:</p>	
MEDIA MAÑANA	
<p>COMIDA</p> <p>Primer plato:</p> <p>Segundo plato:</p> <p>Postre:</p> <p>Pan:</p> <p>Bebida:</p>	
<p>Café:</p> <p>Aceite:</p>	
MERIENDA	
CENA	
<p>Postre:</p> <p>Pan:</p> <p>Bebida:</p>	
<p>Aceite:</p>	
ENTRE HORAS	

Especifique con qué frecuencia ha consumido los siguientes grupos de alimentos:

FRUTA			
	DÍA	SEMANA	MES
Fresca			
Cocida (compotas...)			
En almíbar			
Nombre las 3 frutas que ha consumido con más frecuencia esta temporada:			

HORTALIZAS CRUDAS (Ensaladas y gazpachos)			
	DÍA	SEMANA	MES
Como plato principal			
Como acompañamiento			
Nombre las 3 hortalizas que ha consumido con más frecuencia CRUDAS esta temporada:			

HORTALIZAS COCINADAS (Incluyendo purés)			
	DÍA	SEMANA	MES
Como plato principal			
Como acompañamiento			
Nombre las 3 hortalizas que ha consumido con más frecuencia COCINADAS esta temporada:			

PESCADO(Incluyendo tronquitos de cangrejo y atún de lata)			
	DÍA	SEMANA	MES
Pescados			
Nombre los 3 pescados que ha consumido con más frecuencia esta temporada:			

LEGUMBRES			
	DÍA	SEMANA	MES
Legumbres			
Nombre las 3 legumbres que ha consumido con más frecuencia esta temporada:			

HUEVOS			
	DÍA	SEMANA	MES
Huevos			
Especifique si son de corral o normales:			

ALIMENTOS FUNCIONALES			
	DÍA	SEMANA	MES
Enriquecidos en w3			
Enriquecidos en soja			
Enriquecidos en fibra			
Benecol, danacol, etc...			

ACEITES O GRASAS	oliva	girasol	otros (especificar)
Ensaladas			
Guisos			
Frituras			

